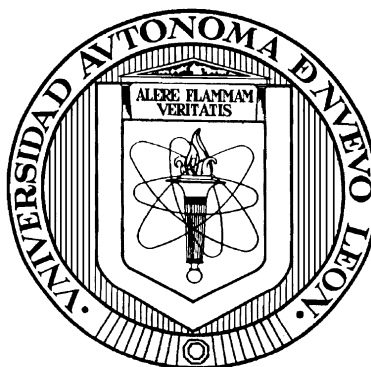


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACIÓN DEL EFECTO HIPOGLUCEMIANTE E
HIPOCOLESTEROLEMIANTE DE *Lentinus lepideus*,
Calvatia cyathiformis Y *Ganoderma applanatum*
DEL NORESTE DE MÉXICO**

Por

M.C.P. EDUARDO JAVIER TAMEZ DE LA O

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en
Farmacología y Toxicología**

Diciembre del 2007.

**EVALUACIÓN DEL EFECTO HIPOGLUCEMIANTE E
HIPOCOLESTEROLEMIANTE DE *Lentinus lepideus*,
Calvatia cyathiformis Y *Ganoderma applanatum*
DEL NORESTE DE MÉXICO**

Aprobación de la Tesis:

Dr.med. LOURDES GARZA OCAÑAS
Director de Tesis

Dr.med. OSCAR TORRES ALANÍS
Co-Director de Tesis

Dr.C. YOLANDA ALCARAZ CONTRERAS
Comisión de Tesis

MC. HUMBERTO GARZA ULLOA
Comisión de Tesis

Dr.C. XOCHITL SOFIA RAMIREZ GOMEZ
Comisión de Tesis

Dr. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
de Estudios de Posgrado

**EVALUACIÓN DEL EFECTO HIPOGLUCEMIANTE E
HIPOCOLESTEROLEMIANTE DE *Lentinus lepideus*, *Calvatia
cyathiformis* Y *Ganoderma applanatum*
DEL NORESTE DE MÉXICO**

Presentado por:

M.C.P Eduardo Javier Tamez de la O

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. bajo la dirección de la Dr. med. Lourdes Garza Ocañas y la codirección del Dr. med. Oscar Torres Alanís, la Dr. C. Yolanda Alcaraz Contreras, el M.C. Humberto Garza Ulloa y la Dr.C. Xóchitl Sofía Ramírez Gómez.

Eduardo Javier Tamez de la O

Fecha de Graduación: Diciembre 2007

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina.

Título del estudio: EVALUACIÓN DE EL EFECTO
HIPOGLUCEMIANTE E
HIPOCOLESTEROLEMIANTE DE *Lentinus lepideus*,
Calvatia cyathiformis Y *Ganoderma applanatum*
DEL NORESTE DE MÉXICO.

Número de páginas: 86

Candidato para la obtención del
Grado de Doctor en Ciencias con
Especialidad en Farmacología y
Toxicología.

Área de Estudio: Farmacología y Toxicología.

Propósito y Método del Estudio: Los macromicetos han sido usados ampliamente en la medicina tradicional de países orientales para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo la diabetes mellitus y la hipercolesterolemia, recientemente han sido postulados como fuentes naturales de sustancias bioactivas con actividad antitumoral e inmunomoduladora. México es un país destacado por su alta diversidad de hongos y la evaluación de la actividad biológica de los mismos es un campo poco estudiada a la fecha. En este trabajo se realizó la evaluación sistemática de la actividad hipoglucemiante e hipocolesterolemiante de tres especies de macromicetos del Noreste de México: *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* con el propósito de detectar a las especies con potencial terapéutico. Las especies se aislaron y cultivaron *in vitro* en fase acuosa a partir de muestras obtenidas en fase sólida y se realizaron extracciones metanólicas y acuosas de la biomasa. El efecto hipoglucemiante e hipocolesterolemiante se evaluó mediante la medición de los niveles plasmáticos de glucosa y colesterol basal y a las tres y seis horas posteriores a la administración de extractos metanólicos y acuosos de cada especie a ratas Wistar a las cuales se les produjo diabetes con el modelo experimental de aloxana. Se realizó el fraccionamiento inicial biodirigido de *Lentinus lepideus* mediante precipitación fraccionada. Se obtuvieron 4 fracciones (FI, FII, FIII, FIV) y se evaluó su actividad biológica, encontrándose que las fracciones FII y FIII fueron las más potentes y su efecto hipoglucemiante fue igual al de glibenclamida.

Contribuciones y conclusiones: En el presente trabajo se reporta por primera vez la actividad hipoglucemiante de tres especies de macromicetos (*Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* del Noreste de México) y de las fracciones obtenidas de *Lentinus lepideus*.

Se propone que las especies de macromicetos evaluados tienen sustancias hipoglucemiantes con potencial terapéutico en la diabetes mellitus.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS

Dr. med. Lourdes Garza Ocañas

AGRADECIMIENTOS

A “DIOS”, gracias por permitirme culminar un nuevo escalón en mi paso efímero por esta vida y haberme brindado tanto apoyo y amistad de mis compañeros.

A mi esposa Blanca y mis hijos Andrea, Fernanda y Eduardo, a los cuales les agradezco su comprensión, amor y apoyo incondicional, aún a costas del demérito de la cantidad de tiempo dedicada a ellos durante esta etapa de mi vida.

A mis padres, el Sr. Raúl Andrés Tamez Flores (finado) y la Sra. María de Lourdes Irene de la O de Tamez, por darme su amor y entereza, y transmitirme su moral, buenas costumbres, dedicación, y facilitarme el camino para el transcurso por la vida.

A la Dr.med. Lourdes Garza Ocañas así como a el Dr.med. Oscar Torres Alanís, asesor y co-asesor de esta tesis, por formar parte de mi Comité de Tesis, por brindarme su amistad, la aportación de su conocimiento, sus valiosas sugerencias e interés en la culminación del presente trabajo.

A el MC. Humberto Garza Ulloa, Dra.C. Yolanda Alcaraz Contreras y Dra.C. Xóchitl Sofía Ramírez Gómez miembros del comité de tesis, por su amistad y sus valiosas sugerencias e interés, en la realización y revisión del presente trabajo.

A mis amigos Dr.C.Victor A. Tamez Rdz, Dr.C. Teresa Zanatta Calderón, MC. Rubén Luján Rangel, Dr.C.Patricia González Barranco, Dr.Carlos E. Reyes Martínez, Dr.César A. Nuñez Herrera, C.P Margarita Martínez Segura y Rosamaría Martínez Segura y todos los que por alguna omisión no se encuentran nombrados aquí, por el apoyo que siempre me han brindado y por la aportación desinteresada de sus habilidades y conocimientos.

A mis amigos del DSA y a todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo.

A PAICYT-UANL proyecto (SA 1163-05) por el apoyo parcial otorgado para la realización de este trabajo.

GRACIAS, Dios los Bendiga.

RESÚMEN AUTOBIOGRÁFICO

EDUARDO JAVIER TAMEZ DE LA O
Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con
Especialidad en Farmacología y Toxicología

Título de Tesis: Evaluación del efecto hipoglucemiante e hipocolesterolemizante de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* del Noreste de México.

Área de estudio: Farmacología y Toxicología.

Biografía:

Datos personales: Lugar y fecha de nacimiento: Monterrey, N.L., México; el 6 de Enero de 1967. Estado civil: casado.

Escolaridad: Licenciatura de Médico Cirujano Partero por la Facultad de Medicina 1992.

Experiencia profesional: Personal profesional no docente, médico, en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L de Marzo de 1993 a la fecha. Maestro del curso práctico de Farmacología y Toxicología desde Marzo de 1993 a la fecha. Maestro del curso teórico de Farmacología y Toxicología desde Marzo del 2007 a la fecha. Co-investigador en la Unidad de Farmacología Clínica desde 1997 a 2004. Co-investigador Responsable de la Unidad de Farmacología Clínica en el Departamento de Farmacología y Toxicología desde 2004 a la fecha. Médico responsable en guardias Sábado y Domingo en el Departamento Médico del Deportivo San Agustín A.C. desde Marzo de 1993 a la fecha. Médico responsable de consulta en Dispensario San Ángel de Cáritas Parroquial, de Mayo de 1994 a Agosto de 1999.

Distinciones:

Reconocimiento como: Estudiante distinguido en el Programa de Doctorado en Ciencias con Especialidad en Farmacología y Toxicología. Facultad de Medicina, U.A.N.L., 2005.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MATERIAL Y MÉTODO.....	19
2.1 MATERIAL.....	19
2.1.1 Material biológico.....	19
2.1.1.1 Material fúngico.....	19
2.1.1.2 Animales.....	20
2.1.2 Material y equipo.....	20
2.1.3 Reactivos.....	22
2.1.3.1 Reactivos para el cultivo <i>in vitro</i> de los macromicetos.....	22
2.1.3.2 Reactivos para el fraccionamiento.....	23
2.1.3.3 Reactivos para la determinación de proteínas.....	23

Capítulo	Página
2.1.3.4 Reactivos para la determinación de carbohidratos.....	23
2.1.3.5 Reactivos para establecer el modelo de diabetes experimental.....	24
2.2 MÉTODOS.....	25
2.2.1 Preparación del medio de cultivo sólido.....	25
2.2.2 Preparación del medio de cultivo líquido.....	25
2.2.3 Cultivo de los macromicetos en medio sólido...	25
2.2.4 Cultivo de los macromicetos en medio líquido..	26
2.3.0 Obtención de la biomasa.....	26
2.3.1 Obtención de los extractos metanólicos a partir de la biomasa.....	27
2.3.2 Obtención de los extractos acuosos a partir de la biomasa.....	28
2.4.0 Evaluación de la actividad hipoglucemiante e hipocolesterolemiantes de los extractos de macromicetos.....	28
2.4.1 Establecimiento del modelo animal de diabetes experimental con aloxana.....	29

Capítulo	Página
2.4.2 Evaluación del efecto hipoglucemiante e hipocolesterolemizante de los extractos acuosos y metanólicos.....	30
2.4.3 Administración de extractos acuosos y metanólicos de <i>Lentinus lepideus</i> , <i>Calvatia cyathiformis</i> y <i>Ganoderma applanatum</i> a las ratas diabéticas.....	32
2.4.4 Esquema de administración de los tratamientos.....	33
2.4.5 Medición de niveles plasmáticos de glucosa y colesterol.....	34
2.5.0 Análisis estadístico.....	35
2.6.0 Fraccionamiento inicial biodirigido de extractos de <i>Lentinus lepideus</i>	35
2.6.1 Precipitación fraccionada.....	36
2.6.2 Obtención de las fracciones FI y FII.....	36
2.6.3 Obtención de las fracciones FIII y FIV.....	36
2.7.0 Evaluación de la actividad biológica de las fracciones FI, FII, FIII y FIV.....	37

Capítulo	Página
2.8.0 Análisis fitoquímico biodirigido de <i>Lentinus lepideus</i>	37
2.8.1 Determinación de proteínas.....	38
2.8.2 Preparación de la muestra a analizar.....	39
2.8.3 Medición de proteínas totales.....	39
2.8.4 Determinación de carbohidratos.....	39
2.8.5 Preparación de las muestras a evaluar.....	40
2.8.6 Medición del contenido de carbohidratos.....	40
3 RESULTADOS	41
3.1 Material fúngico.....	41
3.2 Cultivo <i>in vitro</i> de los macromicetos.....	42
3.2.1 Cultivo de macromicetos en medio sólido.....	42
3.2.2 Cultivo de macromicetos en medio líquido.....	43
3.3 Obtención de la biomasa de los macromicetos.....	44
3.4 Obtención de los extractos acuosos y metanólicos de <i>L. lepideus</i> , <i>C. cyathiformis</i> y <i>G. applanatum</i>	45
3.5 Evaluación de la actividad hipoglucemiante de los extractos acuoso y metanólico de <i>L. lepideus</i> , <i>C. cyathiformis</i> y <i>G. applanatum</i>	46

Capítulo	Página
3.5.1 Evaluación de la actividad hipoglucemiante de los extractos acuosos y metanólicos de <i>L. lepideus</i>	46
3.5.2 Evaluación de la actividad hipoglucemiante de los extractos acuosos y metanólicos de <i>C.</i> <i>cyathiformis</i>	48
3.5.3 Evaluación de la actividad hipoglucemiante de los extractos acuosos y metanólicos de <i>G.</i> <i>applanatum</i>	50
3.5.4 Comparación del efecto hipoglucemiante de los extractos metanólicos de <i>L. lepideus</i> , <i>C. cyathiformis</i> y <i>G. applanatum</i>	52
3.5.5 Comparación del efecto hipoglucemiantes de los extractos acuosos de <i>L. lepideus</i> , <i>C. cyathiformis</i> y <i>G.</i> <i>applanatum</i>	54
3.6 Evaluación del efecto hipocolesterolemiante de los extractos acuosos y metanólicos de <i>L. lepideus</i> , <i>C. cyathiformis</i> y <i>G. applanatum</i>	55
3.6.1 Evaluación del efecto hipocolesterolemiante de los extractos acuosos y metanólicos de <i>L. lepideus</i>	56
3.6.2 Evaluación del efecto hipocolesterolemiante de los extractos acuosos y metanólicos de <i>C.</i> <i>cyathiformis</i>	57

3.6.3 Evaluación del efecto hipocolesterolemizante de los extractos acuosos y metanólicos de <i>G.</i> <i>applanatum</i>	58
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

x

Capítulo	Página
3.7 Fraccionamiento inicial biodirigido de <i>Lentinus lepideus</i>	59
3.8 Evaluación de la actividad hipoglucemiante de las fracciones FI, FII, FIII y FIV obtenidas de <i>Lentinus lepideus</i>	59
3.9 Análisis fitoquímico biodirigido de las fracciones más activas de <i>Lentinus lepideus</i>	63
4 DISCUSIÓN	65
5 CONCLUSIONES	71
PERSPECTIVAS	72
BIBLIOGRAFÍA	73
APENDICE A	81
APENDICE B	84

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Aspecto de varias especies de macromicetos: A) <i>Ganoderma lucidum</i> , B) <i>Lentinus edodes</i> , C) <i>Cordyceps sinensis</i> , D) <i>Auricularia auricula-judae</i> , E) <i>Grifola frondosa</i> y F) <i>Coriolus versicolor</i>	7
2. Obtención de los extractos acuosos y metanólico a partir de la biomasa de <i>G. applanatum</i> , <i>C. cyathiformis</i> y <i>L. lepideus</i>	28
3. Técnica utilizada para la administración de aloxana, vía intraperitoneal a ratas Wistar machos.....	30
4. Técnica utilizada para la administración de los extractos por sonda orogástrica a ratas Wistar machos.....	33
5. Técnica utilizada para la obtención de la sangre de la vena caudal de la rata.....	34
6. Aspecto de los carpóforos de las especies de macromicetos evaluadas.....	41
7. Aspecto del crecimiento miceliar de macromicetos en medio sólido: A) <i>Lentinus lepideus</i> , B) <i>Calvatia cyathiformis</i> y C) <i>Ganoderma applanatum</i>	42
8. Aspecto de los cultivos de macromicetos en medio líquido. A) <i>Lentinus lepideus</i> , B) <i>Calvatia cyathiformis</i> y C) <i>Ganoderma applanatum</i>	43

Figura	Página
9. Aspecto de la biomasa filtrada: A) <i>Lentinus lepideus</i> , B) <i>Calvatia cyathiformis</i> y C) <i>Ganoderma applanatum</i>	44
10. Efecto de los extractos acuosos y metanólicos de <i>Lentinus lepideus</i> sobre los niveles plasmáticos de glucosa.	47
11. Efecto de los extractos acuosos y metanólicos de <i>Calvatia cyathiformis</i> sobre los niveles plasmáticos de glucosa.	49
12. Efecto de los extractos acuosos y metanólicos de <i>Ganoderma applanatum</i> sobre los niveles plasmáticos de glucosa.	51
13. Comparación del efecto de los extractos metanólicos de <i>L. lepideus</i> , <i>C. cyathiformis</i> y <i>G. applanatum</i> sobre los niveles plasmáticos de glucosa.....	52
14. Efecto de los extractos acuosos de <i>L. lepideus</i> , <i>C. cyathiformis</i> y <i>G. applanatum</i> sobre los niveles plasmáticos de glucosa.	54
15. Efecto de los extractos acuosos y metanólicos de <i>Lentinus lepideus</i> sobre los niveles plasmáticos de colesterol.	56
16. Efecto de los extractos acuosos y metanólicos de <i>C. cyathiformis</i> , sobre los niveles plasmáticos de colesterol.	57
17. Efecto de los extractos acuosos y metanólicos de <i>G. applanatum</i> sobre los niveles plasmáticos de colesterol.	58

Figura	Página
18. Efecto de las fracciones de <i>Lentinus lepideus</i> sobre los niveles plasmáticos de glucosa.	60
19. Efecto de las fracciones de <i>Lentinus lepideus</i> sobre los niveles plasmáticos de glucosa y su comparación con Glibenclamida.....	62

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Clasificación de la diabetes de acuerdo a la Asociación Americana de Diabetes.....	2
2. Las 10 principales causas de mortalidad en mujeres.....	3
3. Las 10 principales causas de mortalidad en hombres.....	4
4. Algunos macromicetos utilizados por sus propiedades medicinales en Oriente.....	8
5. Principales efectos terapéuticos reportados para especies de macromicetos de oriente.....	9
6. Grupos formados para cada uno de los tratamientos con los extractos acuosos	31
7. Grupos formados para cada uno de los tratamientos con los extractos metanólicos.....	32
8. Miligramos (mg) y porciento de recuperación (%) de extractos metanólicos.....	45
9. Miligramos (mg) y porciento de recuperación (%) de extractos acuosos.....	46
10. Efecto de los extractos acuosos y metanólicos de <i>Lentinus lepideus</i> sobre los niveles plasmáticos de glucosa.....	48
11. Efecto de los extractos acuosos y metanólicos de <i>Calvatia</i>	

<i>cyathiformis</i> sobre los niveles plasmáticos de glucosa.	50
--------------------------------------------------------------------	----

Tabla	Página
12. Efecto de los extractos acuosos y metanólicos de <i>Ganoderma applanatum</i> sobre de los niveles plasmáticos de glucosa.....	51
13. Efecto de extractos metanólicos sobre los niveles plasmáticos de glucosa.....	53
14. Efecto de extractos acuosos sobre los niveles plasmáticos de glucosa.....	55
15. Cantidad obtenida (mg) y % de recuperación de las fracciones de FI, FII, FIII y FIV de <i>Lentinus lepideus</i>	59
16. Efecto de las fracciones FI, FII, FIII y FIV de <i>Lentinus lepideus</i> sobre los niveles plasmáticos de glucosa.....	61
17. Efecto de las fracciones FI, FII, FIII y FIV de <i>Lentinus lepideus</i> sobre los niveles plasmáticos de glucosa y su comparación con Glibenclamida.....	63
18. Contenido en % de proteínas y carbohidratos de las fracciones FII y FIII.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Absorbancia
a.C.	Antes de Cristo
Acu.	Acuoso
cm	Centímetro
CaCl ₂	Cloruro de calcio
NaCl	Cloruro de sodio
FeCl ₃	Cloruro férrico
dL	Decilitro
D.C.	Después de Cristo
D.E.	Desviación Estándar
D-glucosa	Dextrosa
enf.	Enfermedad
etc.	Etcétera
Ext. Acu.	Extracto acuoso
Ext. Met.	Extracto metanólico
°C	Grados Centígrados
g	Gramo

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	Fosfato de amonio
KH_2PO_4	Fosfato de potasio monobásico
h	horas
IC	Intervalo de confianza

xvii

INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
IP	Intraperitoneal
kg	Kilogramo
L	Litro
Met	metanólico
μg	Microgramo
μL	Microlitro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
min	Minuto
(-)	Negativo
n	Número de muestra
pH	Potencial de hidrógeno
%	Por ciento
(+)	Positivo
PQM	Productos Químicos Monterrey
r.p.m.	Revoluciones por minuto
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de Magnesio heptahidratado

UV

Ultravioleta

VIS

Visible

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

La diabetes fue descrita por primera vez en el papiro de Ebers descubierto en la tumba de Tebas en 1862, cuya escritura está fechada entre 3000 y 1500 a.C.^{1,2}.

La primera utilización del término de “Diabetes Mellitus” se atribuye a Aretaeus de Cappadocia y Apolonius de Menfis durante el siglo II d.C. El término diabetes proviene de las raíces griegas, “*día*” (a través) y “*betes*” (pasar), debido a que en esta enfermedad los nutrientes pasan a través del sistema urinario sin ser utilizados. “*Mellitus*” es una palabra del latín que se refiere a “miel” o “dulce” ^{1,2}.

La diabetes mellitus es un síndrome metabólico caracterizado por la presencia de hiperglucemia crónica, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia, trastornos circulatorios subsecuentes, insuficiencia renal entre otros.

La Asociación Americana de Diabetes, estandarizó la clasificación de la diabetes en diabetes mellitus tipo I y tipo II (Tabla 1)

Diabetes Mellitus Tipo I	Diabetes Mellitus Tipo II
Relacionada con la inmunidad	Gestacional
Ideopática	Factores genéticos
	Factores endocrinos
	Por fármacos o químicos
	Por infecciones

Tabla 1. Clasificación de la diabetes de acuerdo a la Asociación Americana de Diabetes.

La Diabetes es un importante problema de salud en el mundo entero, ya que aproximadamente el 5% de la población mundial padece diabetes. De acuerdo al envejecimiento de la población y a los malos hábitos de vida actual, las proyecciones mundiales sugieren que más de 300 millones de personas tendrán diabetes para el año 2025 y el costo global de tratar esta enfermedad y sus complicaciones alcanzará un trillón de dólares anuales³⁻⁷.

Ha recibido especial atención debido a su prevalencia e incidencia a nivel mundial y en especial en México, país en donde ocupa un lugar destacado en la morbilidad, siendo actualmente la principal causa de muerte, superando al cáncer y problemas cardiovasculares³⁻⁵.

De acuerdo a los reportes del INEGI, la incidencia de mortalidad en mujeres debida a diabetes mellitus en el año 2003 fue de un 15.45% (61.8 casos de muerte por cada 100,000 mujeres) y ocupó el primer lugar en incidencia de mortalidad (Tabla 2) ⁶

Tabla 2

Las 10 principales causas de mortalidad en mujeres.				
No.	Causa	Defunciones	Tasa*	%
1	Diabetes mellitus	32,354	61.8	15.4
2	Enfermedades isquémicas del corazón	22,758	43.5	10.9
3	Enfermedad cerebro vascular	14,239	27.2	6.8
4	Enf. pulmonar obstructiva crónica	7,827	14.9	3.7
5	Afecciones peri-natales	7,039	13.4	3.4
6	Enfermedades hipertensivas	6,653	12.7	3.2
7	Infecciones respiratorias agudas bajas	6,381	12.2	3.0
8	Cirrosis y enf. crónicas hepáticas	6,332	12.1	3.0
9	Nefritis y nefrosis	4,954	9.5	2.4
10	Desnutrición calórico proteica	4,663	8.9	2.2
* Tasa por 100,000 habitantes Fuente: INEGI, Dirección General de Información en Salud. Secretaria de Salud, México.2003				

La incidencia de mortalidad por diabetes mellitus en los hombres en el 2003 fue menor que la de las mujeres (10.3%) sin embargo, fue la segunda causa de muerte. (Tabla 3) ⁶

Tabla 3

Las 10 principales causas de mortalidad en hombres.				
No.	Causa	Defunciones	Tasa*	%
1	Enfermedades isquémicas del corazón	27,978	54.0	10.7
2	Diabetes mellitus	26,730	51.6	10.3
3	Cirrosis y enf. crónicas hepáticas	20,478	39.5	7.9
4	Enfermedad cerebro vascular	12,604	24.3	4.8
5	Enf. Pulmonar obstructiva crónica	10,286	19.8	3.9
6	Afecciones peri-natales	9,986	19.3	3.8
7	Agresiones (homicidios)	8,660	16.7	3.3
8	Infecciones respiratorias agudas bajas	7,346	14.2	2.8
9	Accidentes de vehículos de motor	7,289	14.1	2.8
10	Nefritis y nefrosis	5,535	10.7	2.1
* Tasa por 100,000 habitantes Fuente: INEGI, Dirección General de Información en Salud. Secretaria de Salud, México 2003.				

La diabetes mellitus, por su hiperglucemia crónica, produce una serie de complicaciones a corto y largo plazo tales como trastornos de la visión, representando la primer causa de ceguera en México, trastornos de circulación periférica, causando una gran cantidad de incapacidades temporales y permanentes debido a las úlceras, necrosis e incluso amputaciones de extremidades, teniendo un elevado costo económico y social para la comunidad^{4,5,7}.

Es causa de insuficiencia renal crónica, con necesidad de diálisis y trasplante renal, que en la mayoría de las veces no se pueden realizar debido a los trastornos circulatorios concomitantes, que son una contraindicación para la realización de dicha modalidad terapéutica. La incidencia de ataques cardíacos y apoplejías es mayor en pacientes diabéticos. Otro trastorno asociado a la diabetes es la polineuropatía con alteraciones sensitivas y motoras⁴.

Se ha descrito que en México cada 30 segundos alguien pierde una extremidad debido a la diabetes y que 7 de cada 10 amputaciones de piernas se realizan a personas que padecen de diabetes; 85% de las amputaciones de extremidades inferiores van precedidas de una úlcera en el pie. Los costos directos de una amputación asociada al pie diabético se encuentran entre los 30 y 60 mil dólares^{3,4,7}.

Las complicaciones de la diabetes son tan comunes que se ha reportado que de cada 100 personas con diabetes 14 presentan nefropatía, 10 neuropatía, 10 pie diabético (uno de cada 3 termina en amputación) y 5 presentan ceguera. Además los pacientes diabéticos tienen 3 veces más riesgo de padecer cardiopatía o enfermedad cerebro vascular y presentan trastornos depresivos y cambios de personalidad^{3,4,7,8}.

El incremento de las defunciones en México por diabetes mellitus en los últimos años fue más importante en la población mayor de 55 años y

hubo predominio del sexo femenino. Estos reportes concuerdan con lo reportado para otros países como Japón y Estados Unidos^{5,6,9}.

Actualmente la terapéutica convencional de la diabetes mellitus incluye tratamientos farmacológicos tales como la administración de insulina e hipoglucemiantes orales, entre los que se encuentran las sulfonilureas (tolbutamida, glibenclamida) que estimulan la liberación de insulina en páncreas, las biguanidas (metformin), que aumentan el efecto de la insulina en tejidos periféricos e inhiben la gluconeogénesis hepática, las tiazolidinedioas (ciglitazona y pioglitazona) y los inhibidores de la alfa glucosidasa (acarbose). Los tratamientos no farmacológicos incluyen el control adecuado en la dieta, control de peso, realización de ejercicio, etc.¹⁰

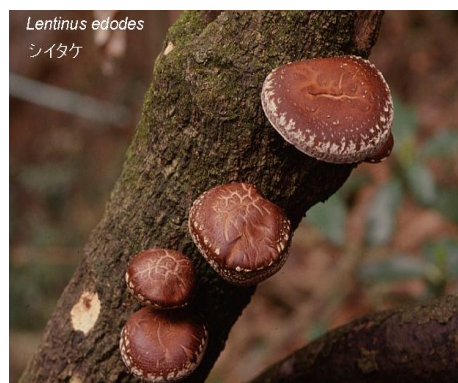
El alto costo de la terapia farmacológica de la diabetes aunado a que el tratamiento debe continuarse toda la vida, ha hecho que el uso de plantas en el tratamiento de ésta enfermedad y de sus complicaciones haya ganado popularidad en las últimas décadas. En México se han utilizado con este fin, plantas tales como *Scrocomia mexicana*, *Anacardium occidentale*, *Bidens pilosa*, *Bromelia baratas*, *Coutarea latiflora*, *Eucalyptus globulus*, *Taraxacum officinalaea*, *Valeriana mexicana*, entre otras¹¹.

Por otro lado es conocido el uso de los hongos (macromicetos) en la medicina tradicional oriental para el tratamiento de diversas enfermedades entre ellas la diabetes¹²⁻¹⁵.

Los macromicetos son hongos macroscópicos que se pueden ver a simple vista y son considerados los más evolucionados del reino Fungi. Estos hongos presentan diversos tamaños, formas y colores (Figura 1).



A)



B)



C)



D)



E)



F)

Figura 1. Aspecto de varias especies de macromicetos: A) *Ganoderma lucidum*, B) *Lentinus edodes*, C) *Cordyceps sinensis*, D) *Auricularia auricula-judae*, E) *Grifola frondosa*, F) *Coriolus versicolor*.

Los macromicetos han sido valorados alrededor del mundo tanto como alimento así como medicamentos naturales desde hace cientos de años. En países asiáticos como China, Corea y Japón han sido utilizados en la medicina tradicional desde hace más de 7000 años¹⁶⁻¹⁸.

Actualmente, el uso de los macromicetos se ha extendido a un gran número de países debido tanto a su aporte nutricional, como a su potencial uso terapéutico.

El potencial terapéutico de diversas especies de macromicetos que crecen en Oriente ha sido demostrado por diversos grupos de investigadores, entre las especies más estudiadas se encuentra el *Lentinus edodes* del cual se aisló la lentina, que es un compuesto con actividad antineoplásica e inmunomoduladora^{15,19-23} (Tabla 4)

Hongos Medicinales Importantes en Oriente

Lentinus edodes

Ganoderma lucidum

Auricularia aurícula-judae

Coriolus versicolor

Grifola frondosa

Tremella fuciformis

Tabla 4. Algunos macromicetos utilizados por sus propiedades medicinales en Oriente.

Dentro de los efectos terapéuticos descritos para los macromicetos se encuentran los siguientes: hipoglucemiante, hipocolesterolemiante, antiviral, antibacteriano, antiinflamatorio, antioxidante, inmunomodulador y antitumoral¹³⁻²³. (Tabla 5)

Efectos terapéuticos de macromicetos de Oriente	
	Hipoglucemiante
	Hipocolesterolemiante
	Antioxidante
	Hepatoprotector
	Antineoplásico
	Antimicrobiano y antiviral

Tabla 5. Principales efectos terapéuticos reportados para especies de macromicetos de oriente

Entre las especies que crecen en Oriente para las cuales se ha demostrado actividad hipoglucemiante e hipocolesterolemiante se encuentran *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Grifola frondosa* y *Cordyceps sinensis*.^{13-15,24}.

Es de particular interés el hecho de que en nuestro país existan especies del género *Ganoderma* como lo es *Ganoderma applanatum* y del género *Lentinus* (*Lentinus lepideus*) las cuales pudieran tener actividad hipoglucemiante e hipocolesterolemiantes de acuerdo a quimiotaxonomía.

Dentro de los basidiomicetos orientales más estudiados en cuanto a sus propiedades medicinales tenemos:

Lentinus edodes.

También conocido como Shiitake, es el segundo hongo comestible más comúnmente producido en el mundo. Su uso en Asia data desde hace más de 2000 años. De este macromiceto se aisló la lentina, compuesto patentado por actividad antineoplásica la cual está mediada por la estimulación del sistema inmune^{19,20,21}.

Se ha demostrado que glucoproteínas contenidas en la biomasa de este macromiceto son los compuestos responsables de los efectos hipoglucemiantes.

Otros efectos reportados para este hongo son inmunomoduladores, antineoplásicos, hipocolesterolemiantes, hepatoprotector, así como, actividad antimicrobiana, antiviral y antitrombótica^{14,22-27, 28}.

Además de la lentina, de este macromiceto también se aisló un compuesto denominado eritadenina caracterizado por producir una disminución de los niveles de colesterol en plasma²⁹.

Se ha reportado que dosis altas de eritadenina pueden causar la disminución de lipoproteínas de muy baja densidad y que de manera semejante a la proteína de la soya, la eritadenina reduce los niveles sanguíneos de colesterol, disminuyendo la tasa de conversión de fosfatidilcolina a fosfatidiletanolamina en los microsomas hepáticos³⁰.

Varios estudios clínicos realizados con extractos de *Lentinus edodes* en Japón, han mostrado decrementos importantes en el colesterol sérico en mujeres jóvenes y personas mayores de 60 años de edad¹⁶.

Ganoderma lucidum.

Es un importante hongo medicinal perteneciente a la familia Ganodermatacea, el cual ha sido usado con diversos fines terapéuticos³¹⁻³³.

Este macromiceto conocido como Reishi, ha sido empleado en China, Corea y Japón con fines terapéuticos desde hace cientos de años.

Se ha demostrado el efecto benéfico de los extractos de *Ganoderma lucidum* en el tratamiento del cáncer, hipertensión, hipercolesterolemia así como su efecto hepatoprotector y antibacteriano^{26,34-39}.

De particular interés para este trabajo es el efecto hipoglucemiante producido por glicoproteínas aisladas de este hongo así como su efecto hipocolesterolemiante^{13,34,35}.

En resumen se ha demostrado que los extractos de *Ganoderma lucidum* mostraron actividad hipoglucémica al incrementar la insulina plasmática en la diabetes inducida por aloxana en ratones⁴⁰.

Grifola frondosa.

Conocido también como *Maitake*, se encuentra comúnmente en el Este de Estados Unidos, Europa, Asia y raramente en el oeste de Estados Unidos.

Inicialmente los recolectores de *Maitake* en Japón guardaban celosamente y nunca divulgaban su localización, hasta que se desarrollaron las técnicas de cultivo en 1979, y se produjo en grandes cantidades por los cultivadores japoneses¹⁶.

De este macromiceto se han aislado α - y β -D-glucanos, predominando los segundos como componente mayoritario, además de contener grifolan, grifolin-LE, proteínas, lectina, 5' nucleótidos, lípidos, entre otros⁴¹⁻⁴³.

Se usa por sus propiedades para disminuir la presión sanguínea, disminución de lípidos plasmáticos, efecto hepatoprotector, disminución de la glucosa plasmática, estimular el sistema inmune y propiedades antineoplásicas, entre otros usos^{44,45}.

Ganoderma applanatum:

Es un hongo común en América. Su nombre lo recibe por lo aplanado de su forma. Contiene varios compuestos esteroides tales como ergosterol, triterpenoides tales como el ácido Ganoderenico y furanoganoderico⁴⁶.

Ha demostrado tener propiedades inmunoestimulantes en estudios en animales. Los polisacáridos que posee estimulan la actividad antitumoral y la respuesta celular de anticuerpos^{17,18,26,27,47,48,77}.

Se ha usado en la medicina tradicional China para tratar el cáncer de esófago. También se le describen propiedades antimicrobianas e hipoglucemiantes^{47, 48}.

Modelos de Diabetes experimental en animales:

Se han descrito diferentes procedimientos para inducir diabetes experimental en animales. Entre ellos tenemos a los procedimientos quirúrgicos, tales como la pancreatectomía total y subtotal, la diabetes

hipofisaria y meta hipofisaria, diabetes producida por sustancias químicas tales como estreptozotocina y aloxana, diabetes tiroidea y metatiroidea, diabetes esteroidea y la diabetes espontánea experimental⁵¹.

El modelo de diabetes experimental con aloxana es uno de los que más se encuentran reportados en la literatura ya que produce un cuadro semejante al que se presenta en la diabetes en el humano.

Diabetes por aloxana:

En las investigaciones de Glasgow en 1943 se describió la acción diabetógena de la aloxana. La aloxana es un compuesto que proviene de la degradación del ácido úrico y su fórmula es CNHO-COCOCNHO .

La aloxana produce necrosis de los islotes con desaparición de las células beta. Los fenómenos posteriores a su administración siguen tres etapas:

En las primeras 4 horas posteriores a la administración, se presenta un aumento de la glicemia seguido de una segunda fase con un descenso progresivo y prolongado de la misma.

En la tercera fase se manifiestan los signos de la diabetes: hiperglucemia, glucosuria y cetosis las cuales se completan, en general, a las 48 horas.

La aloxana afecta directa y selectivamente a las células beta de los islotes de Langerhans, respetando a las células alfa y delta.

La necrosis de las células beta se inicia de inmediato y se completa en las primeras 48 horas posteriores a la administración de aloxana.

En los animales refractarios a la acción de la aloxana, la diabetes es transitoria y las lesiones degenerativas mejoran lentamente. Este modelo produce complicaciones similares a las que se producen en las diabetes humanas.

México es un país destacado por su alta diversidad de hongos, y se considera que existen en el país 200,000 especies, de las cuales se conocen aproximadamente 7000 que se han estudiado y clasificado taxonómicamente^{49,50}.

Considerando los antecedentes de actividad hipoglucemiante e hipocolesterolemia de especies de macromicetos que crecen en oriente, se decidió llevar a cabo el estudio sistémico de tres especies de macromicetos del Noreste de México con el fin de evaluar su actividad hipoglucemiante e hipocolesterolemia y determinar su utilidad como posibles fuentes de compuestos con potencial farmacológico.

En base a criterios quimiotaxonómicos y etnofarmacológicos, en esta investigación se decidió evaluar el efecto hipoglucemiante e hipocolesterolemiante de los macromicetos: *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* del Noreste de México en un modelo de diabetes experimental inducido con aloxana.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto hipoglucemiante e hipocolesterolemiante de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* del Noreste de México.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Cultivar los macromicetos en fase acuosa *in vitro* a partir de muestras obtenidas de los cultivos en fase sólida.
- 2.- Obtener extractos acuosos y metanólicos a partir de biomasa (micelio) de los macromicetos.
- 3.- Establecer el modelo de diabetes experimental en ratas.
- 4.- Evaluar el efecto de los extractos acuosos y metanólicos de los macromicetos sobre los niveles plasmáticos de glucosa y colesterol.
- 5.- Fraccionamiento inicial biodirigido de los extractos con mayor actividad o de particular interés.
- 6.- Evaluar el efecto de las fracciones obtenidas sobre los niveles plasmáticos de glucosa y colesterol.
- 7.- Realizar un análisis fitoquímico biodirigido de las fracciones más activas o de particular interés.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

2.1.1.1 Material fúngico

Los macromicetos evaluados en este estudio fueron obtenidos a partir de cultivos de carpóforos frescos de *Ganoderma applanatum*, *Calvatia cyathiformis* y *Lentinus lepideus*, los cuales fueron recolectados en los bosques templados de coníferas y encinos del municipio de Galeana, N.L. en el año 2001. Los hongos fueron aislados, clasificados taxonómicamente y registrados en el Departamento de Silvicultura de la Facultad de Ciencias Forestales de la U.A.N.L., campus Linares.

2.1.1.2 Animales

Se utilizaron ratas Wistar machos de 8 semanas de edad, con un peso promedio de 100 ± 20 g, las cuales fueron obtenidas del bioterio del Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina, de la U.A.N.L. Los animales fueron colocados en jaulas de acrílico con tapa de rejillas metálicas y se mantuvieron a una temperatura de 22 a 24 °C, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, con alimentación y agua *ad libitum*.

2.1.2 MATERIAL Y EQUIPO

Algodón

Agitadores magnéticos

Autoclave (*Marke Forge Sterilmatic*)

Balanza analítica (*Mettler-Toledo AB204*)

Balanza granataria (*Mettler-Toledo PB3002*)

Batidora manual (*Braun multiquick*)

Bolsas de celofán de diferentes tamaños

Cajas de Petri desechables (*Corning*)

Campana de Flujo laminar (*Labconco*)

Centrífuga Spinchrone (*Beckman*)

Cinta testigo para autoclave

Cubeta de cuarzo con un trayecto óptico de 1 cm

Embudos

Equipo de disección

Espectrofotómetro UV-VIS, modelo DU-7500 (*Beckman*)

Frascos de vidrio de 100, 250 y 500 mL (*Pirex*)

Glucómetro (*Accutrend GCT*)

Gradillas

Guantes desechables (*Protec*)

Jaulas de acrílico con rejillas de metal

Jeringas estériles de 1, 3 y 5 mL (*BD*)

Liofilizador VirTis Freezemobile 12 mod. 6211-0120 (*Labconco*)

Matraces Erlenmeyer de 250 y 500 mL (*Pirex*)

Matraces para liofilizar de 150 mL (*Labconco*)

Micropipetas de 10-100, 20-200, 100-1000 y 1000-5000 μ L
(*Eppendorf*)

Papel aluminio

Papel filtro número 1 (*Whatman*)

Parafilm (*Pechiney Plastic Packaging*)

Pipetas serológicas de 5, 10 y 25 mL (*Pirex*)

Pipetas Pasteur de vidrio y desechables (*Kimble*)

Placa de calentamiento con agitador magnético (*Sigma*)

Potenciómetro ϕ 50pHmeter (*Beckman*)

Probetas de 25, 50, 100 y 500 mL (*Pirex*)

Puntas para micropipetas (*Eppendorff*)

Rotavapor 011 (*Büchi*)

Tiras para determinar glucosa (*Accutrend*)

Tiras para determinar colesterol (*Accutrend*)

Tiras para determinar pH (*Macherey-Nagel*)

Tubos de vidrio de 5 y 10 mL (*Pirex*)

Tubos para centrífuga

Vasos de precipitado de 100, 250, 500, 1,000 y 3,000 mL
(*Pirex*)

Vórtex (*American Scientific Products*)

2.1.3 REACTIVOS

2.1.3.1 Reactivos para el cultivo *in vitro* de los macromicetos

Ácido cítrico (*PQM*)

Agar (*DIFCO*)

Agua destilada

Cloruro de calcio (*Merck*)

Cloruro férrico (*Sigma*)

Cloruro de sodio (*Sigma*)

D-(+) Glucosa (*Sigma*)

Extracto de levadura (*Bioxón*)

Extracto de malta (*Bioxón*)

Fosfato de amonio (*Sigma*)

Fosfato de potasio monobásico (*Sigma*)

Fosfato de sodio dibásico (*Baker*)

Hidrocloreuro de tiamina (*Sigma*)

Sulfato de magnesio heptahidratado (*PQM*)

2.1.3.2 Reactivos para el fraccionamiento

Ácido acético glacial (*Fermont*)

Agua bidestilada

Etanol (*Fermont*)

Hidróxido de sodio (*Sigma*)

Metanol (*Fermont*)

Oxalato de amonio (*Fermont*)

2.1.3.3 Reactivos para la determinación de proteínas

Albúmina sérica bovina (*Sigma*)

Carbonato de sodio (*Merck*)

Hidróxido de sodio (*Sigma*)

Reactivo de Folín-Ciocalteu (*Sigma*)

Sulfato de cobre (*Sigma*)

Tartrato de sodio y potasio (*Sigma*)

2.1.3.4 Reactivos para la determinación de carbohidratos

Ácido sulfúrico (*Sigma*)

Agua bidestilada

Fenol (*PQM*)

2.1.3.5 Reactivos para establecer el modelo de diabetes experimental.

Aloxana (*Sigma*)

NaCl al 0.9% (*PISA*)

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Preparación del medio de cultivo sólido.

Para la preparación del medio se utilizó el medio de Melin-Norkrans modificado, a pH 6.5, con agar bacteriológico para solidificar. El medio se esterilizó colocándolo en la autoclave por 15m., y se colocó en cajas de Petri estériles⁵².

2.2.2 Preparación del medio de cultivo líquido.

El medio de cultivo líquido se preparó igual que el medio sólido, únicamente se eliminó el agar. Y este se colocó en matraces Erlen-Meyer estériles.

2.2.3 Cultivo de los macromicetos en medio sólido.

El cultivo de los macromicetos fue realizado en condiciones de esterilidad, dentro de una campana de flujo laminar y material estéril. A partir de las cepas puras de *Ganoderma applanatum*, *Calvatia cyathiformis* y *Lentinus lepideus*, se tomaron muestras del micelio del hongo con un bisturí estéril, las cuales fueron colocadas en las cajas de Petri

que contenían medio modificado de Melin Norkrans, a pH de 6.5, utilizando agar como medio solidificante. Posteriormente, las cajas fueron selladas con parafilm y se incubaron durante 1 mes a 25°C, con ciclos luz-oscuridad de 12 horas.

2.2.4 Cultivo de los macromicetos en medio líquido.

El cultivo en medio líquido fue realizado a partir de los macromicetos obtenidos en el medio sólido y en condiciones de esterilidad.

Del medio sólido de cada cepa se obtuvieron discos o inóculos que fueron depositados en matraces Erlen-Meyer de 500 mL que contenían 150 mL de medio modificado de Melin-Norkrans, a pH de 6.5.

Posteriormente, los matraces fueron sellados con tapones de gasa estéril y papel aluminio y se incubaron durante 2 meses a 25 °C, con ciclos luz-oscuridad de 12 h.

2.3.0 Obtención de la biomasa.

Después de dos meses de crecimiento miceliar en el medio de cultivo líquido, la biomasa fue recuperada por filtración y se lavó varias veces con agua destilada.

La biomasa obtenida fue liofilizada hasta sequedad y posteriormente, se pesó, se etiquetó y se almacenó en oscuridad, a 25 °C.

2.3.1 Obtención de los extractos metanólicos a partir de la biomasa.

A un gramo de la biomasa seca y molida de cada macromiceto se le realizaron tres extracciones a temperatura ambiente, con 30 mL de metanol cada vez. Los extractos metanólicos obtenidos fueron evaporados a presión reducida en un rotavapor a 30 °C.

Los extractos, recuperados con agua bidestilada, fueron liofilizados, pesados, etiquetados y almacenados a 4 °C en oscuridad hasta su utilización (Figura 2).

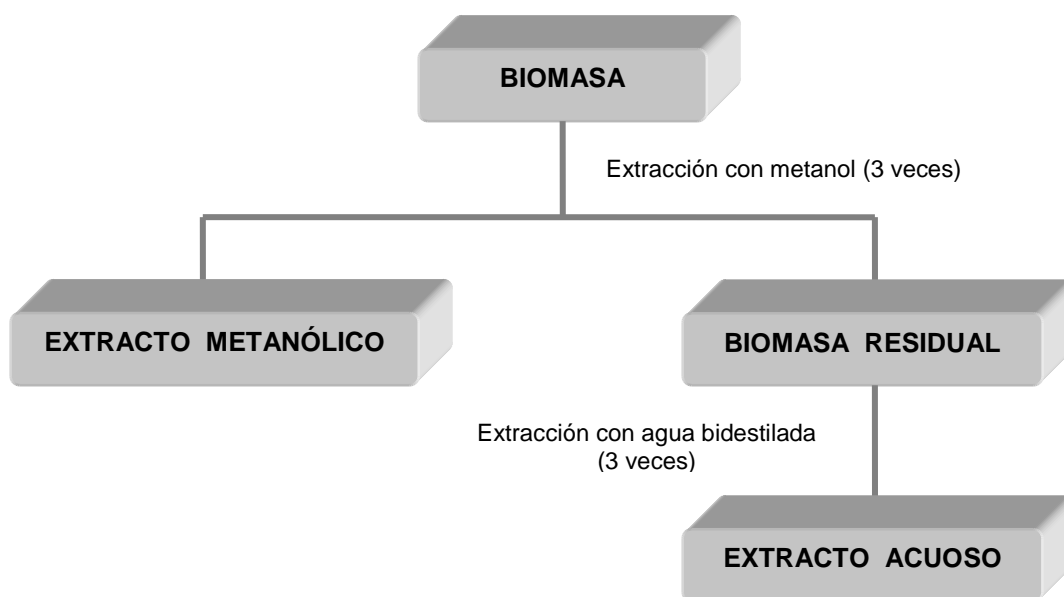


Figura 2. Obtención de los extractos acuosos y metanólicos a partir de la biomasa seca de *Ganoderma applanatum*, *Calvatia cyathiformis* y *Lentinus lepideus*.

2.3.2 Obtención de los extractos acuosos a partir de la biomasa.

El residuo obtenido después de realizar la extracción metanólica fue extraído 3 veces con agua bidestilada (25 mL). Los extractos obtenidos fueron liofilizados, pesados, etiquetados y almacenados a 4 °C en oscuridad hasta su utilización (Figura 2).

2.4.0 Evaluación de la actividad hipoglucemiante e hipocolesterolemia de los extractos de macromicetos.

2.4.1 Establecimiento del modelo animal de diabetes experimental con aloxana

Para establecer el modelo de diabetes experimental con aloxana, se utilizaron ratas Wistar machos, de 8 semanas de edad, 80 a 120 g de peso, a las cuales se les identificó marcándolas con tinta indeleble. Previo a la administración de la aloxana los animales se mantuvieron en ayuno de 12 horas, se realizó la obtención de muestras de sangre de las venas caudales por incisión, y las muestras se recolectaron con capilares. Para la realización de la medición de los niveles basales de glucosa y colesterol se utilizó un equipo portátil Acutrend GCT®.

Posterior a la medición y registro de los niveles basales de glucosa y colesterol, se procedió a la administración de la solución de aloxana a dosis de 300 mg/kg dividida en 2 administraciones de 150 mg/kg cada una, las cuales fueron aplicadas con una diferencia de 72 horas, vía intraperitoneal (Figura 3). Las ratas permanecieron en ayuno 8 horas posteriores a cada administración.

A las 72 horas de la segunda administración de aloxana se procedió a realizar medición de los niveles de glucosa y colesterol y se seleccionaron las ratas para las cuales se logró

establecer el modelo de diabetes experimental con aloxana. El criterio establecido para considerar que se había desarrollado la diabetes en los animales fue la detección de niveles de glucosa de 200 mg/dL ó mayores.



Figura 3. Técnica utilizada para la administración de aloxana vía intraperitoneal a ratas Wistar machos.

2.4.2 Evaluación del efecto hipoglucemiante e hipocolesterolemia de los extractos acuosos y metanólicos.

El efecto de los extractos sobre los niveles plasmáticos de glucosa y colesterol se evaluó en ratas Wistar macho de

8 semanas de edad, a las cuales se les estableció previamente el modelo de diabetes experimental con aloxana. Se formaron 7 grupos (n=10) para la administración de los extractos metanólicos y 7 grupos (n=10) para la administración de los extractos acuosos. Se utilizó un grupo como control positivo de efecto hipoglucemiante, a los animales de este grupo se les administró glibenclamida y un grupo control positivo de efecto hipocolesterolemiantes el cual recibió lovastatina. A los animales del grupo control negativo se les administró el solvente (solución fisiológica).

Los grupos formados y dosis utilizadas para la administración de los extractos acuosos se muestran en la Tabla 6.

EXTRACTOS ACUOSOS

GRUPO	TRATAMIENTO	DOSIS
I	<i>Lentinus lepideus</i>	100 mg/kg
II	<i>Calvatia cyathiformis</i>	100 mg/kg
III	<i>Ganoderma applanatum</i>	100 mg/kg
IV	Solución salina (control-)	0.5 mL
V	Glibenclamida (control+)	5 mg/kg
VI	Lovastatina (control +)	0.5 mg/kg

n=10

Tabla 6. Grupos formados para cada uno de los tratamientos con los extractos acuosos.

Los grupos formados y dosis utilizadas para la administración de los extractos metanólicos se muestran en la Tabla 7.

EXTRACTOS METANÓLICOS

GRUPO	TRATAMIENTO	DOSIS
I	<i>Lentinus lepideus</i>	100 mg/kg
II	<i>Calvatia cyathiformis</i>	100 mg/kg
III	<i>Ganoderma applanatum</i>	100 mg/kg
IV	Solución salina (control-)	0.5 mL
V	Glibenclamida (control+)	5 mg/kg
VI	Lovastatina (control +)	0.5 mg/kg

n=10

Tabla 7. Grupos formados para cada uno de los tratamientos con los extractos metanólicos.

2.4.3 Administración de extractos acuosos y metanólicos de *Lentinus lepideus*, *calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* a las ratas diabéticas.

Previo a la administración de los tratamientos con los extractos los animales fueron puestos en ayuno de 6 horas.

Posteriormente se tomaron muestras de sangre de la vena caudal y se les realizaron la determinación de los niveles basales de glucosa y colesterol antes de la administración de cada uno de los tratamientos.

Los extractos fueron diluidos en solución fisiológica, a las dosis establecidas y se administraron por sonda orogástrica (ver figura 4).



Figura 4. Técnica utilizada para la administración de los extractos por sonda orogástrica a ratas Wistar machos

2.4.4 Esquema de administración de los tratamientos.

Los tratamientos con los extractos de las especies evaluadas y controles, fueron administrados diariamente, durante 5 días, entre las 8 y 10 horas.

Los grupos control negativo recibieron el solvente (solución fisiológica) en que se disolvieron los extractos.

2.4.5 Medición de niveles plasmáticos de glucosa y colesterol.

La medición de los niveles plasmáticos de glucosa y colesterol se realizaron en tres tiempos cada día: nivel basal, previo a la administración de cada tratamiento, y a las 3 y 6 horas posteriores a la administración de cada tratamiento, durante los 5 días de duración del ensayo clínico (figura 5).



Figura 5. Técnica utilizada para la obtención de sangre de la vena caudal de la rata.

2.5.0 Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y se hicieron comparaciones múltiples por el método de Tukey, a través del programa Statistical Package for the Social Science (SPSS). Se utilizó un nivel de significancia menor de 0.05 para establecer diferencia significativa.

2.6.0 Fraccionamiento inicial biodirigido de *Lentinus lepideus*.

El fraccionamiento de *Lentinus lepideus* se realizó de acuerdo al método estándar para el fraccionamiento de polisacáridos solubles e insolubles en agua, reportados por Mizuno 1986⁵³.

A partir de un gramo de biomasa seca y molida de *Lentinus lepideus* se realizaron extracciones metanólicas y acuosas como se describió anteriormente.

El extracto metanólico se etiquetó como E1 y el extracto acuoso como E2, ambos se almacenaron a 4 °C protegidos de la luz. El residuo que se obtuvo al filtrar el extracto acuoso se extrajo tres veces con 25mL de oxalato de amonio al 1% cada vez, el extracto obtenido se etiquetó como E3, se liofilizó y se almacenó a 4 °C protegido de la luz.

El residuo que se obtuvo al filtrar el extracto de oxalato de amonio se extrajo tres veces con 25 mL de hidróxido de sodio al 5% cada vez, y el extracto obtenido se etiquetó como E4, se liofilizó y se almacenó a 4 °C protegido de la luz.

2.6.1 Precipitación Fraccionada.

2.6.2 Obtención de fracciones FI y FII.

Los extractos E2 y E3 se disolvieron en 25 mL de agua bidestilada, posteriormente se les adicionó un volumen de etanol a 4 °C, hasta la formación de un precipitado, los precipitados obtenidos a partir de E2 y E3 se recuperaron por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Los precipitados se dializaron, se liofilizaron y se etiquetaron como FI y FII respectivamente y se almacenaron a 4 °C protegidos de la luz.

2.6.3 Obtención de fracciones FIII y FIV

El extracto E4 se disolvió en 25 mL de agua bidestilada y se le agregó ácido acético glacial al 50% para ajustar el pH a 6, inmediatamente se observó la formación de un precipitado el cual se separó por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.

El precipitado se dializó, se liofilizó, se etiquetó como FIII y se almacenó a 4 °C protegido de la luz. Al sobrenadante obtenido en el paso anterior se le agregó un volumen equivalente de etanol y se mantuvo 4 °C hasta la formación de un precipitado, el cual se recuperó por centrifugación, se liofilizó, se etiquetó como FIV y se almacenó a 4 °C protegido de la luz.

2.7.0 Evaluación de la actividad biológica de las fracciones FI, FII, FIII y FIV.

Para cada una de las fracciones se evaluó la actividad biológica midiendo el efecto hipoglucemiante e hipocolesterolemiante.

El método seguido para evaluar la actividad biológica de las fracciones FI, FII, FIII y FIV fue el mismo que se describió anteriormente para la evaluación de los extractos acuosos y metanólicos de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*.

2.8.0 Rastreo fitoquímico biodirigido de *Lentinus lepideus*

De acuerdo a los reportes existentes en la literatura, las sustancias aisladas de macromicetos orientales que han

mostrado efecto hipoglucemiante corresponden a glicoproteínas.

En base a ello se decidió realizar un análisis fitoquímico biodirigido orientado hacia la determinación del contenido de proteínas y carbohidratos en las fracciones FII y FIII que fueron las más activas.

2.8.1 Determinación de proteínas.

La determinación de proteínas se efectuó mediante el método de Lowry. Este método se basa en la formación de un complejo coloreado con las proteínas, que puede ser medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 750 nm⁵⁴.

La reacción se lleva a cabo en 2 etapas:

- a) Los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas, formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Esto provoca un desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, dando lugar a la exposición de los residuos fenólicos de tirosina que participan en la segunda fase de la reacción.
- b) El reactivo de Folin-Ciocalteu se reduce, también en medio alcalino, por acción de los grupos fenólicos de los residuos de tiroxina. El principal constituyente de este reactivo es el ácido fosfomolibdotúngstico, que al ser reducido, forma una serie de óxidos azules de tungsteno y molibdeno.

2.8.2 Preparación de la muestra a analizar.

La muestra del extracto liofilizado se disolvió en agua a una concentración de 0.125 mg/ml.

2.8.3 Medición de proteínas totales.

Se preparó una solución stock de albúmina a una concentración de 100 µg/ml. Se prepararon la solución C y el reactivo de Folin-Ciocalteu. Se elaboró una curva de calibración con distintas concentraciones de albúmina, se preparó la muestra en otro tubo y se le añadió agua hasta completar 1 mL; posteriormente, se agregó la solución C, se agitó en vórtex y se dejó reposar por 15 minutos. Se añadió el reactivo de Folin a cada tubo, se agitó en vórtex y se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos; pasado este tiempo se midió la absorbancia espectrofotométrica a una longitud de onda de 750 nm.

2.8.4 Determinación de carbohidratos.

La determinación del contenido de carbohidratos en la muestra, se llevó a cabo mediante la técnica del fenol-sulfúrico. Esta técnica se basa en la formación de furfural, como consecuencia de la deshidratación de los carbohidratos en presencia de ácido sulfúrico y la posterior condensación con fenoles, dando como productos compuestos de color intenso cuya absorbancia es medida espectrofotométricamente a una longitud de onda de 490 nm⁵⁵.

2.8.5 Preparación de las muestras a evaluar.

Se preparó una solución en agua a una concentración de 0.25 mg/mL de la muestra de las fracciones liofilizadas.

2.8.6 Medición del contenido de carbohidratos.

Se preparó un estándar de glucosa a una concentración de 1 µg/µL y una solución de fenol al 5 %. Se preparó una curva de calibración con distintas cantidades del estándar de glucosa; en otro tubo se colocó la muestra a evaluar. A cada tubo se le añadió agua hasta completar 100 µL, 300 µL de fenol y 2.5 mL de H₂SO₄.

Posteriormente, se agitaron en vórtex y se dejaron reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente la absorbancia se midió espectrofotométricamente a una longitud de onda de 490 nm.

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1 Material fúngico.

La figura 6 muestra el aspecto de los carpóforos de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*. Estos Macromicetos fueron clasificados taxonómicamente y registrados en el Departamento de Silvicultura de la Facultad de Ciencias Forestales de la U.A.N.L., campus Linares.



Lentinus lepideus.



Calvatia cyathiformis.



Ganoderma applanatum

Figura 6. Aspecto de los carpóforos de las especies de macromicetos evaluadas.

3.2 Cultivo *in vitro* de macromicetos.

3.2.1 Cultivo de macromicetos en medio sólido.

En la Figura 7 se muestra el crecimiento micelial de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* en medio sólido de Melin Norkrans, incubados a 25°C, durante 3 a 4 semanas. En estos cultivos se utilizó agar como agente solidificante.

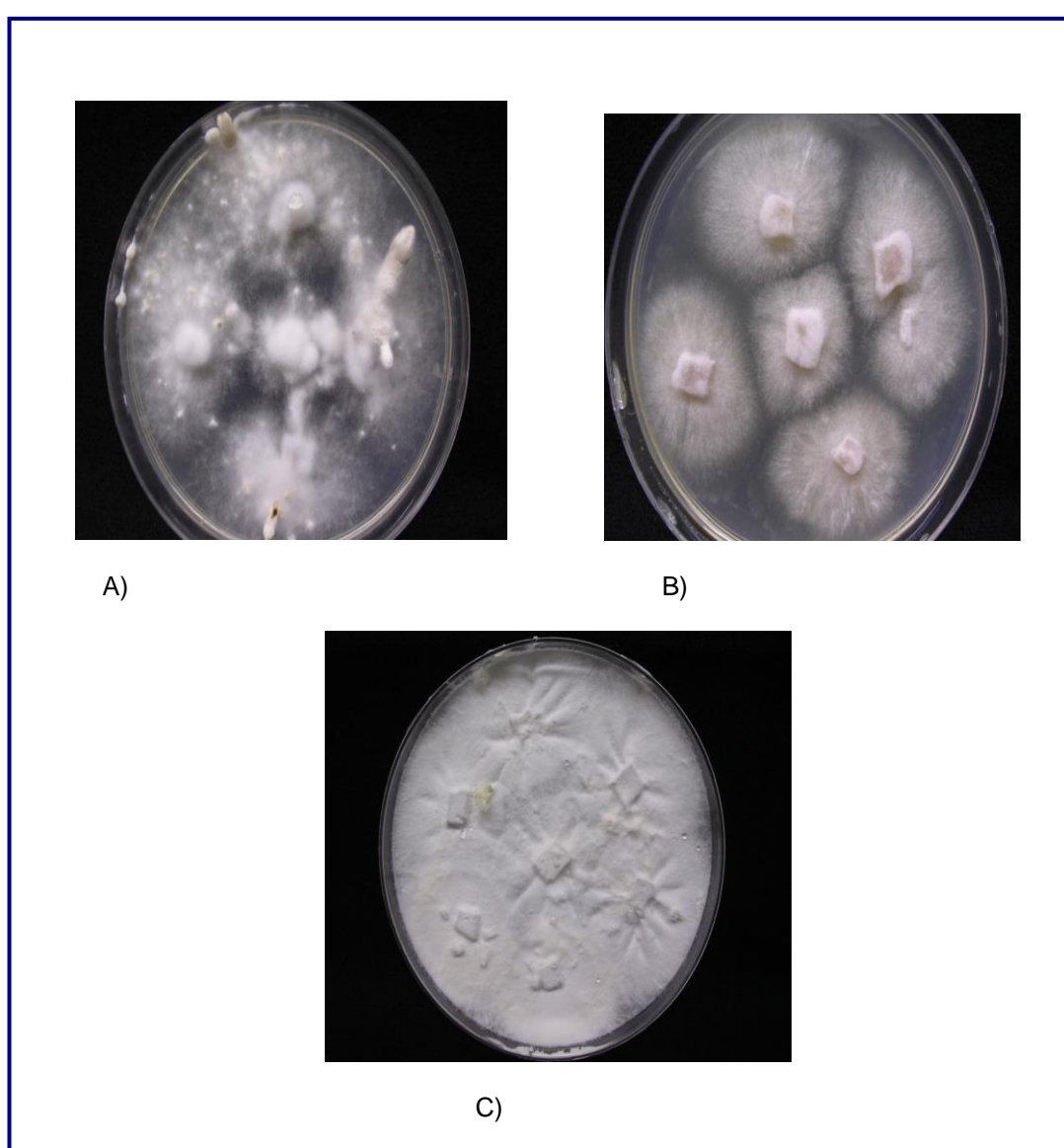


Figura 7. Aspecto del crecimiento micelial de macromicetos en medio sólido: A) *Lentinus lepideus*, B) *Calvatia cyathiformis* y C) *Ganoderma applanatum*.

3.2.2 Cultivo de macromicetos en medio líquido.

En la figura 8 se muestra el crecimiento miceliar de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* en medio líquido de Melin Norkrans e incubados a 25 °C durante 2 meses.

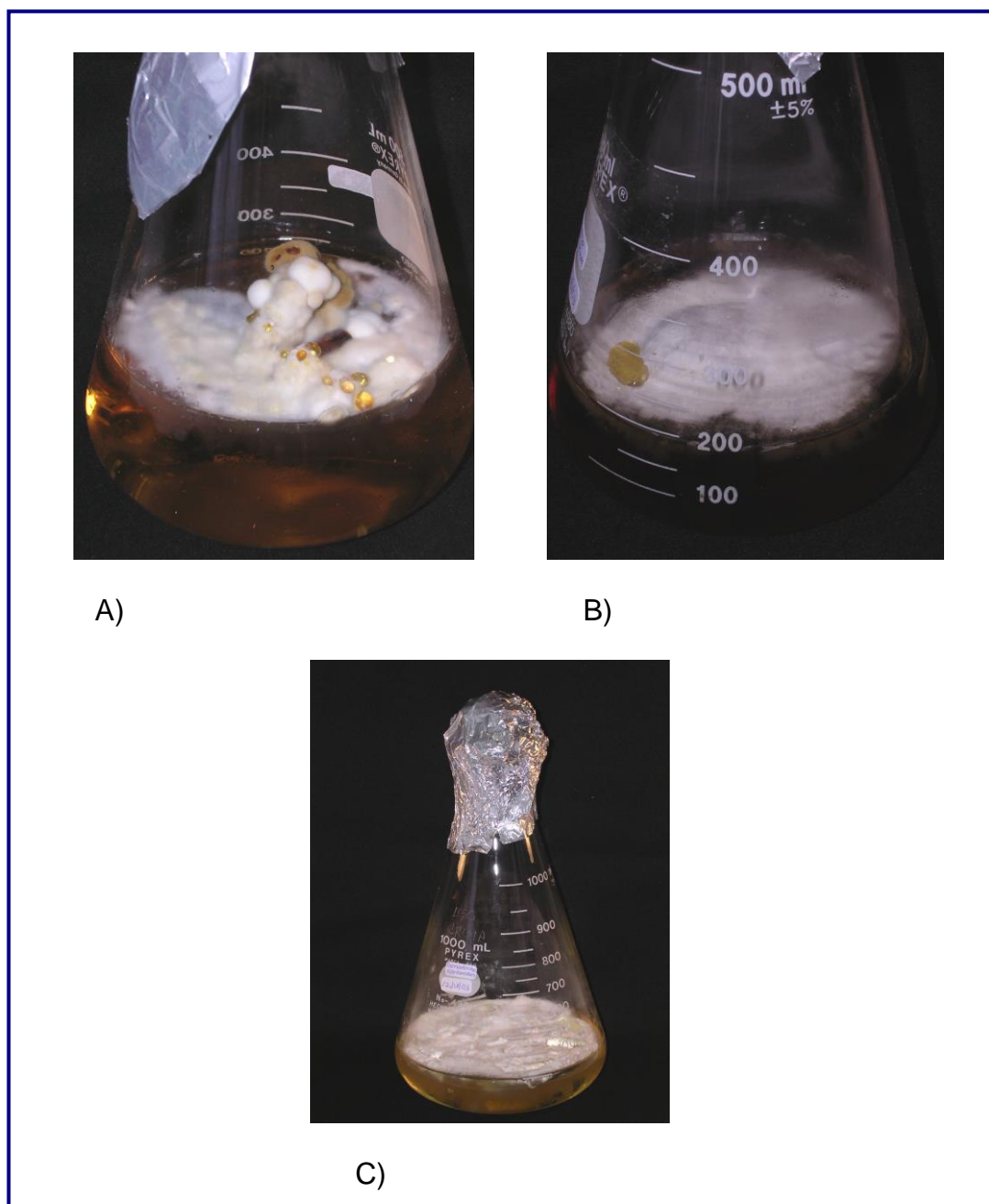


Figura 8. Aspecto de los cultivos de macromicetos en medio líquido. A) *Lentinus lepideus*, B) *Calvatia cyathiformis* y C) *Ganoderma applanatum*.

3.3 Obtención de biomasa de macromicetos.

En la figura 9 se muestra el aspecto de la biomasa filtrada de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*, obtenidas a los 2 meses de incubación a 25 °C.

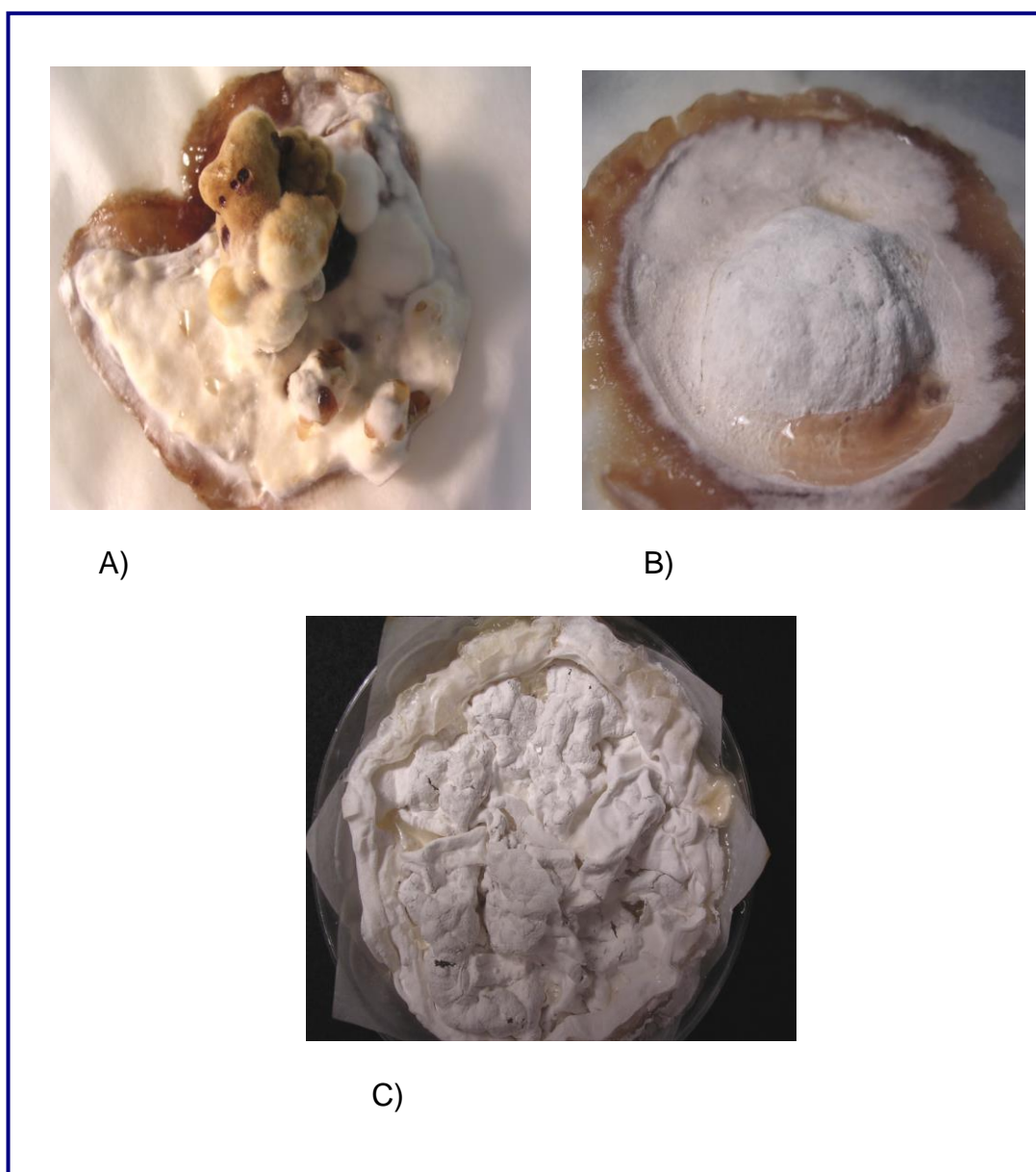


Figura 9. Aspecto de la biomasa filtrada: A) *Lentinus lepideus*, B) *Calvatia cyathiformis* y C) *Ganoderma applanatum*.

3.4 Obtención de extractos acuosos y metanólicos de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*

Las extracciones acuosas y metanólicas se realizaron a partir de la biomasa seca y molida de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*.

En la tabla 8 se muestran las cantidades obtenidas (mg) y el % de recuperación de los extractos metanólicos a partir de 1 g de biomasa seca de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*.

Extractos metanólicos	Cantidad obtenida (mg)	Recuperación (%)
<i>Lentinus lepideus</i>	55 ± 5	5.5
<i>Calvatia cyathiformis</i>	35 ± 5	3.5
<i>Ganoderma applanatum</i>	54 ± 5	5.4

Tabla 8. Miligramos (mg) y porcentaje de recuperación (%) de extractos metanólicos

En la tabla 9 se muestran las cantidades obtenidas y el porcentaje de recuperación de extractos acuosos a partir de 1 g de biomasa seca de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*.

Extractos acuosos	Cantidad obtenida (mg)	Recuperación (%)
<i>Lentinus lepideus</i>	118 ± 5	11.8
<i>Calvatia cyathiformis</i>	141 ± 7	14.1
<i>Ganoderma applanatum</i>	126 ± 7	12.6

Tabla 9. Miligramos (mg) y porciento de recuperación (%) de extractos acuosos.

3.5 Evaluación de la actividad hipoglucemiante de los extractos acuosos y metanólicos de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*.

3.5.1 Evaluación de la actividad hipoglucemiante de los extractos acuosos y metanólicos de *Lentinus lepideus*.

El efecto de los extractos acuosos y metanólicos de *Lentinus lepideus*, sobre los niveles plasmáticos de glucosa se muestran en la figura 10.

Tanto los extractos acuosos como los metanólicos de *Lentinus lepideus* produjeron una disminución estadísticamente significativa de los niveles de glucosa.

En el caso de los extractos metanólicos el efecto se observó tanto a las 3 como a las 6 horas, y con los extractos acuosos se observó solo a las 6 horas.

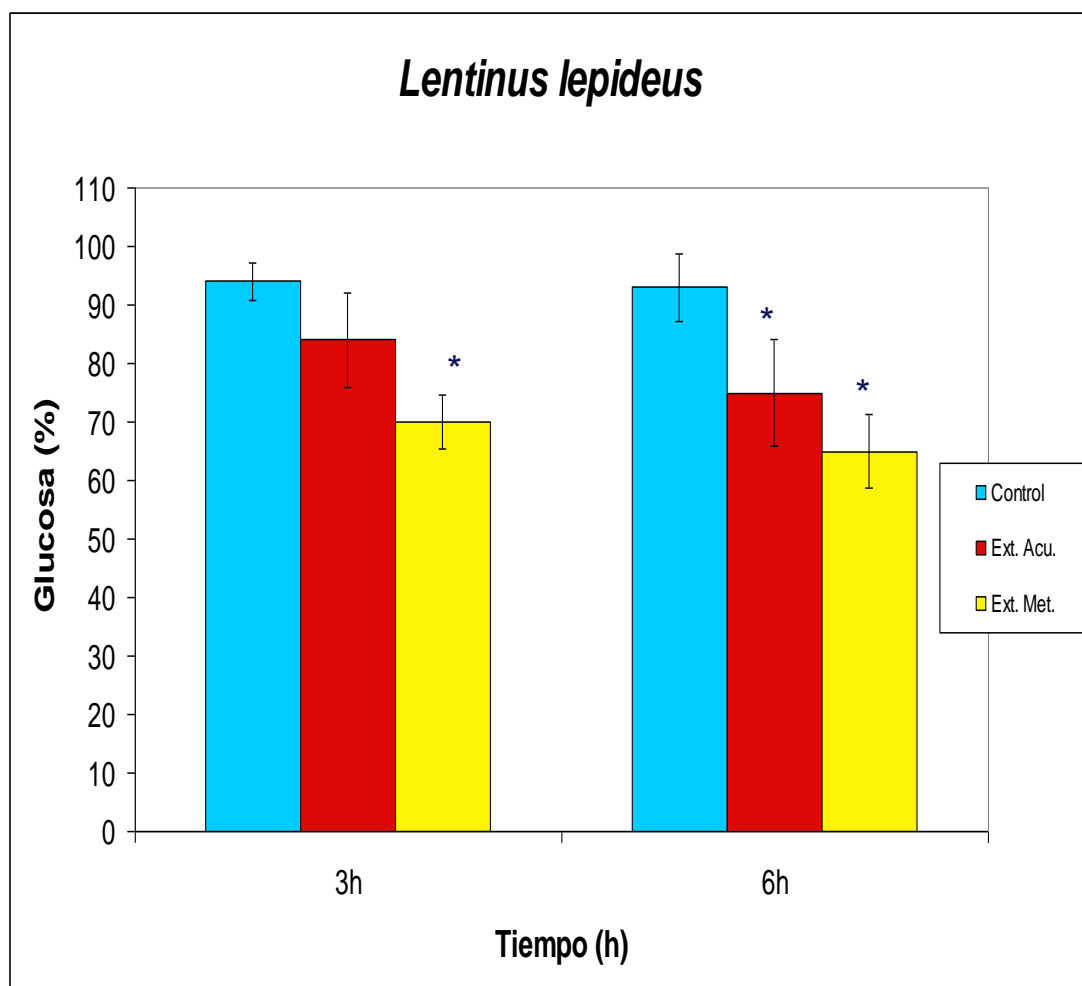


Figura 10. Efecto de los extractos acuosos y metanólicos de *Lentinus lepideus*, sobre los niveles plasmáticos de glucosa. Los datos representan el promedio \pm DE, expresados en %, $n=10$, $*p < 0.05$

La tabla 10 muestra los porcentajes de disminución que produjeron los extractos acuosos y metanólicos de *Lentinus lepideus*, en los niveles de glucosa plasmática, en las mediciones a las 3 y 6 horas.

	Disminución de glucosa Extractos acuosos (%)	Disminución de glucosa Extractos metanólicos (%)
<i>Lentinus lepideus</i>	16% a las 3 h 25% a las 6 h *	30% a las 3 h * 35% a las 6 h *

Tabla 10. Efecto de extractos acuosos y metanólicos de *Lentinus lepideus* sobre los niveles plasmáticos de glucosa. Los datos representan el promedio \pm DE, expresados en %, n=10. *p< 0.05

3.5.2 Evaluación de la actividad hipoglucemiante de los extractos acuosos y metanólicos de *Calvatia cyathiformis*.

Al evaluar el efecto de los extractos acuosos y metanólicos de *Calvatia cyathiformis* sobre los niveles plasmáticos de glucosa se observó que sólo los extractos acuosos produjeron una disminución de los niveles de glucosa estadísticamente significativos.

El efecto de los extractos acuosos y metanólicos de *Calvatia cyathiformis*, sobre los niveles plasmáticos de glucosa se muestran en la figura 11.

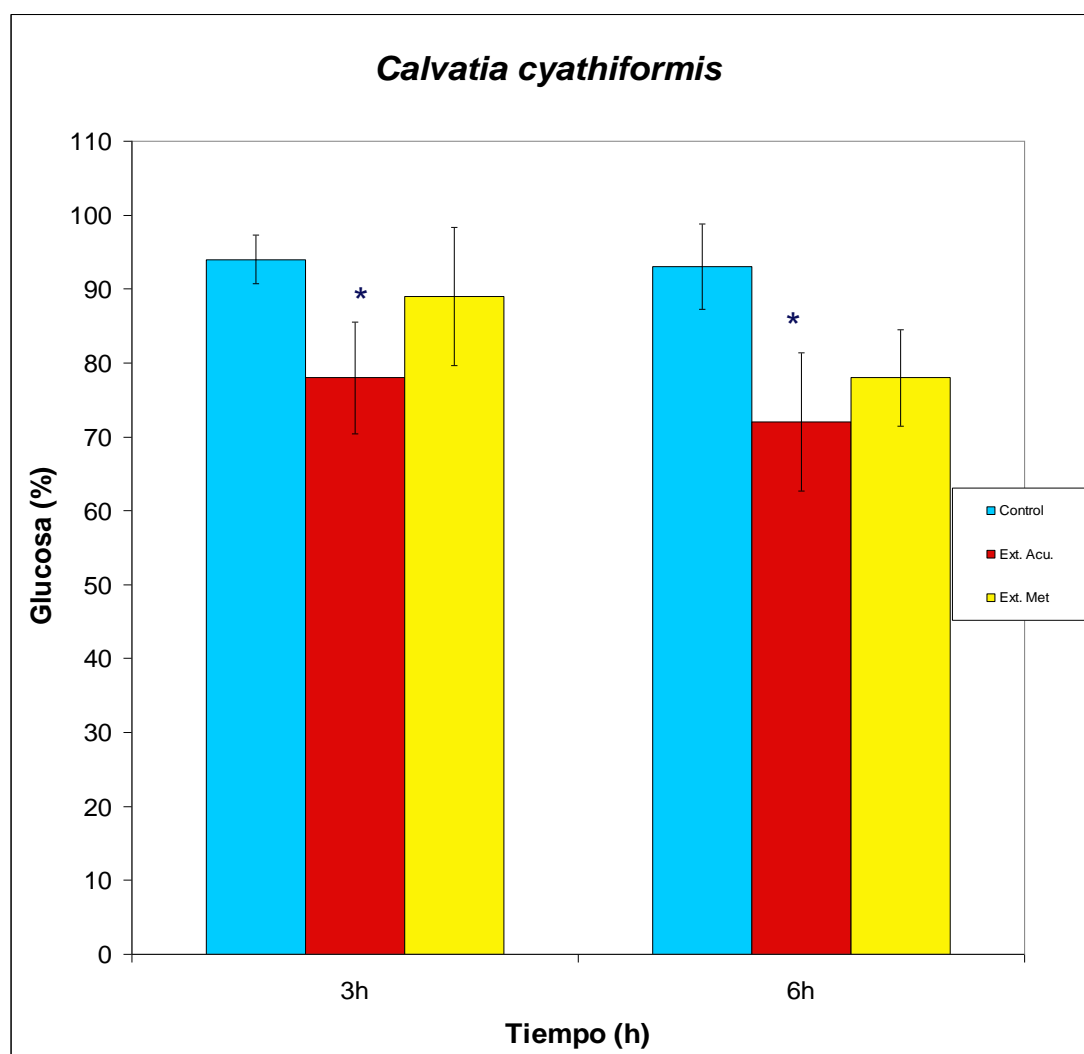


Figura 11. Efecto de los extractos acuosos y metanólicos de *Calvatia cyathiformis*, sobre los niveles plasmáticos de glucosa. Los datos representan el promedio \pm DE, expresados en %, $n=10$, $*p < 0.05$

Los extractos acuosos de *Calvatia cyathiformis* produjeron una disminución estadísticamente significativa de los niveles de glucosa en plasma en la medición de las 3 y 6 horas. Con los extractos acuosos no se observó disminución de los niveles de glucosa.

La tabla 11 muestra los porcentajes de disminución de glucosa producidos por los extractos acuosos y metanólicos de *Calvatia cyathiformis*, en las mediciones de las 3 y 6 horas.

	Disminución de glucosa. Extractos acuosos. (%)	Disminución de glucosa. Extractos metanólicos. (%)
<i>Calvatia cyathiformis</i>	22% a las 3 h * 28% a las 6h *	11% a las 3 h 22% a las 6 h

Tabla 11. Efecto de extractos acuosos y metanólicos de *Calvatia cyathiformis* sobre los niveles plasmáticos de glucosa. Los datos representan el promedio \pm DE, expresados en %, n=10. *p< 0.05

3.5.3 Evaluación de la actividad hipoglucemiante de los extractos acuosos y metanólicos de *Ganoderma applanatum*.

En la figura 12 se muestra el efecto de los extractos acuosos y metanólicos de *Ganoderma applanatum*, sobre los niveles plasmáticos de glucosa. Los extractos acuosos produjeron una disminución estadísticamente significativa de los niveles de glucosa a las 6h. Los extractos metanólicos no disminuyeron los niveles de glucosa en ninguno de los dos tiempos evaluados.

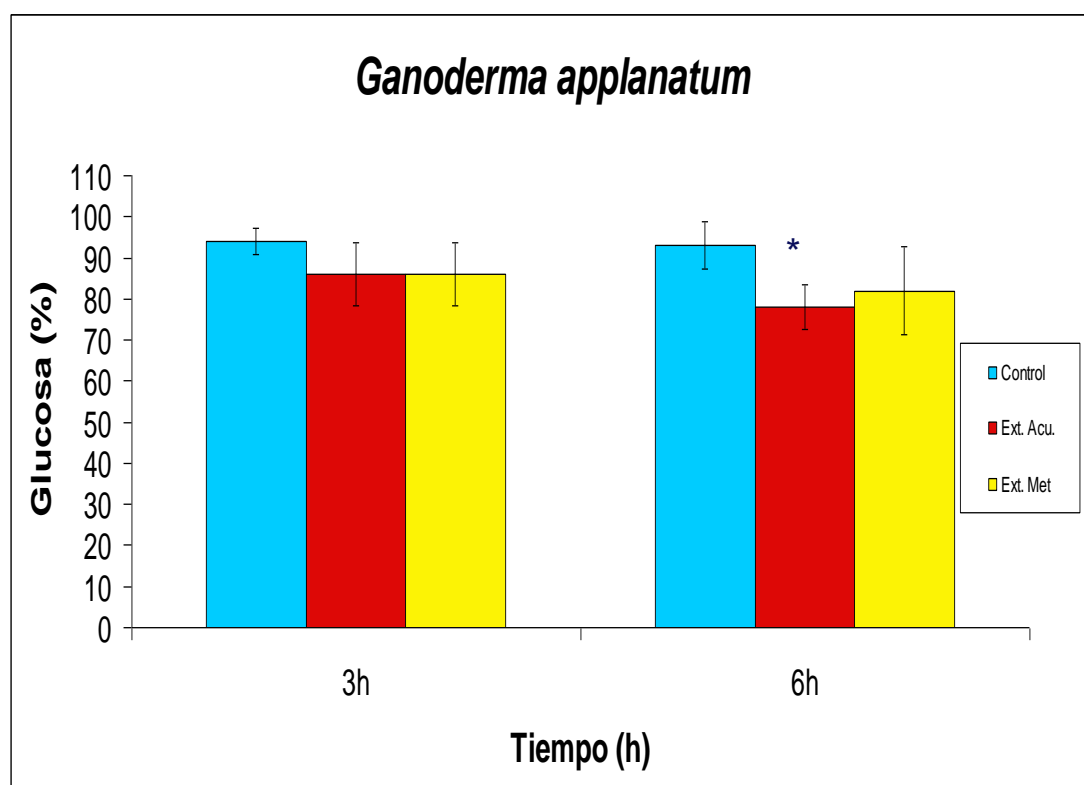


Figura 12. Efecto de los extractos acuosos y metanólicos de *Ganoderma applanatum*, sobre los niveles plasmáticos de glucosa. Los datos representan el promedio \pm DE, expresados en %, $n=10$, $*p < 0.05$

La tabla 12 muestra los porcentajes de disminución que produjeron los extractos acuosos y metanólicos de *Ganoderma applanatum*, en los niveles plasmáticos de glucosa, en las mediciones a las 3 y 6 horas.

	Disminución de glucosa Extractos acuosos (%)	Disminución de glucosa Extractos metanólicos (%)
<i>Ganoderma applanatum</i>	14% a las 3 h 22% a las 6h *	14% a las 3 h 18% a las 6 h

Tabla 12. Efecto de extractos acuosos y metanólicos de *Ganoderma applanatum* sobre los niveles plasmáticos de glucosa. Los datos representan el promedio \pm DE, expresados en %, $n=10$. $*p < 0.05$

3.5.4 Comparación del efecto hipoglucemiante de los extractos metanólicos de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*.

En la figura 13 se muestra la comparación del efecto de los extractos metanólicos de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*, sobre los niveles plasmáticos de glucosa. El extracto metanólico de *Lentinus lepideus* produjo una disminución estadísticamente significativa de glucosa a las 3 y 6h con respecto al control. Los extractos metanólicos de *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* no disminuyeron los niveles de glucosa en ninguno de los dos tiempos

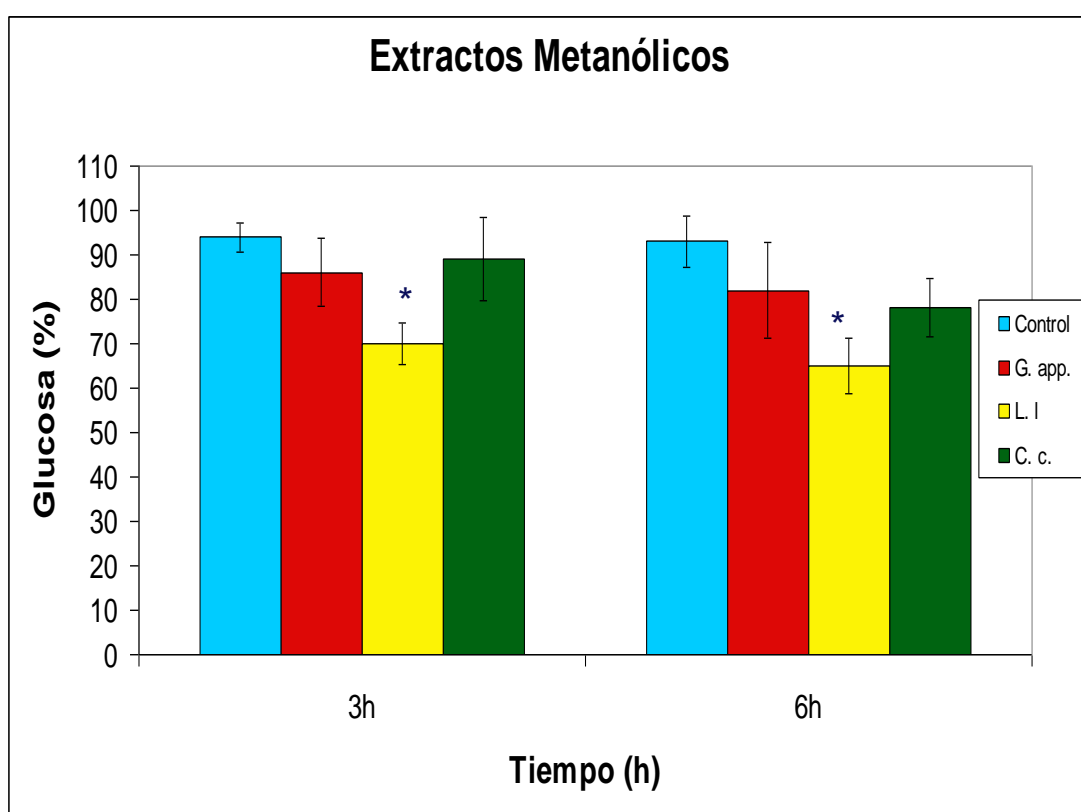


Figura 13. Comparación del efecto de los extractos metanólicos de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* sobre los niveles plasmáticos de glucosa. Los datos representan el promedio \pm DE, expresados en %, n=10. . *p< 0.05

La tabla 13 muestra los porcentajes de disminución en los niveles plasmáticos de glucosa que produjeron los extractos metanólicos de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* a las 3 y 6 horas.

	Disminución de Glucosa (%)
Tratamiento	Extractos metanólicos
<i>Lentinus lepideus</i>	30% a las 3h * 35% a las 6h *
<i>Calvatia cyathiformis</i>	11% a las 3h 22% a las 6h
<i>Ganoderma applanatum</i>	14% a las 3h 18% a las 6h

Tabla 13. Efecto de extractos metanólicos sobre los niveles plasmáticos de glucosa. Los datos representan el promedio \pm DE, expresado en %, n=10.
*p< 0.05

Se encontró que los extractos metanólicos de *Lentinus lepideus* produjeron una disminución estadísticamente significativa de los niveles de glucosa de un 30% a las 3 horas y un 35% a las 6 horas.

Con los tratamientos con los extractos metanólicos de *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* no se observaron diferencias estadísticamente significativas al compararlos con el control.

3.5.5 Comparación del efecto hipoglucemiante de los extractos acuosos de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*.

Los extractos acuosos de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* tuvieron efecto hipoglucemiante al producir una disminución estadísticamente significativa de los niveles de glucosa a las 6 horas figura 14.

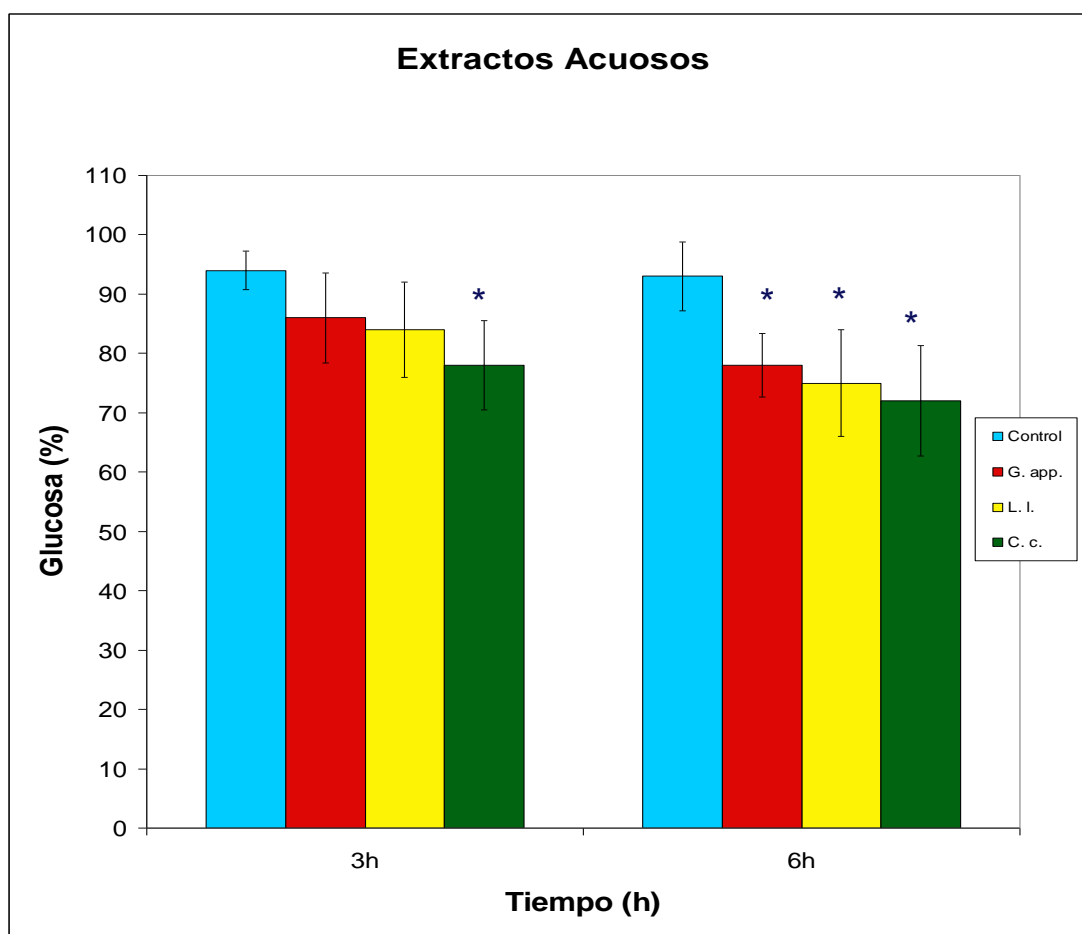


Figura 14. Efecto de los extractos acuosos de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* sobre los niveles plasmáticos de glucosa. Los datos representan el promedio \pm DE, expresados en %, n=10. *p< 0.05

La tabla 14 muestra los porcentajes de disminución que produjeron los extractos acuosos de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* en los niveles de glucosa plasmática, en las mediciones a las 3 y 6 horas.

	Disminución de Glucosa (%)
Tratamiento	Extractos acuosos
<i>Lentinus lepideus</i>	16% 3h
	25% 6h *
<i>Calvatia cyathiformis</i>	22% 3h *
	28% 6h *
<i>Ganoderma applanatum</i>	14% 3h
	22% 6h *

Tabla 14. Efecto de extractos acuosos sobre los niveles plasmáticos de glucosa. Los datos representan el promedio \pm expresado en %, n=10. *p<0.05

Los extractos acuosos de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* produjeron una disminución estadísticamente significativa de los niveles de glucosa de un 25% 28% y 22 % respectivamente a las 6 horas.

3.6 Evaluación del efecto hipocolesterolemiante de los extractos acuosos y metanólicos de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*

3.6.1 Evaluación del efecto hipocolesterolemiante de los extractos acuosos y metanólicos de *Lentinus lepideus*

Al comparar los niveles de colesterol de los grupos tratados con los extractos acuosos y metanólicos de *Lentinus lepideus* con los del grupo control, se observó que ninguno de los extractos produjo una disminución de los niveles de colesterol, figura 15.

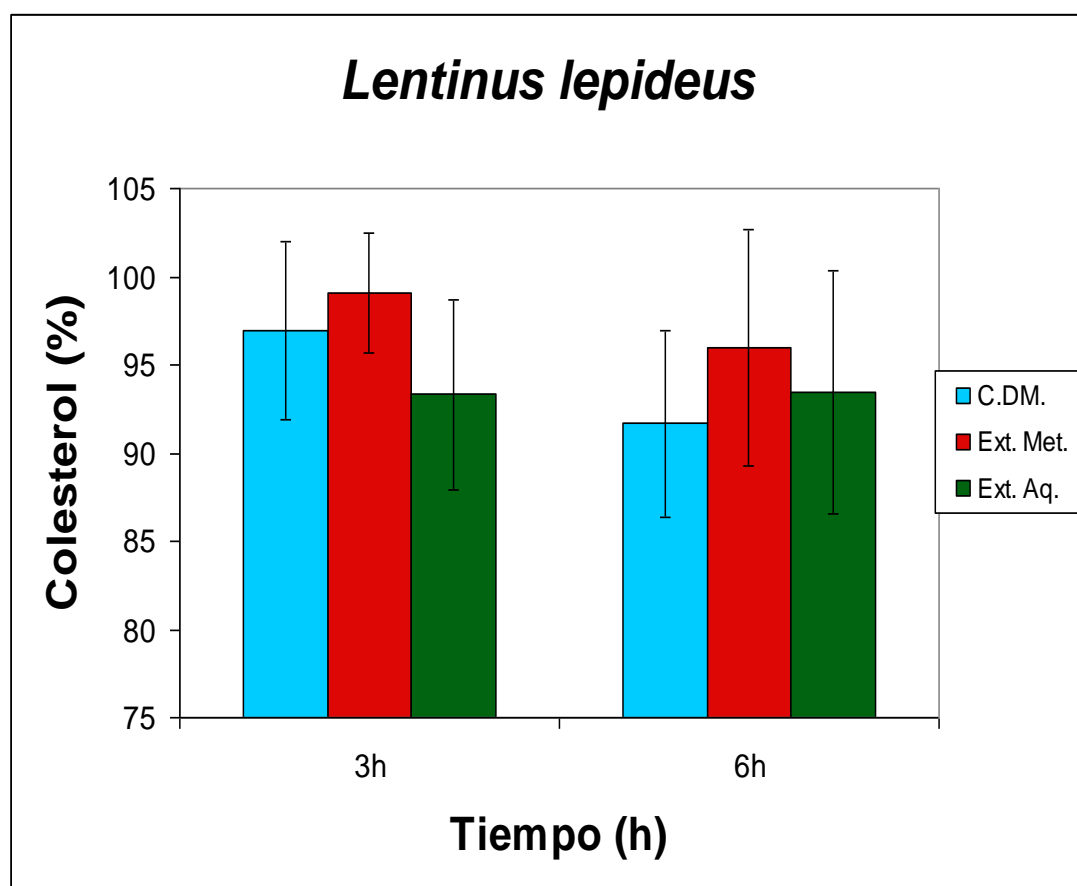


Figura 15. Efecto de los extractos acuosos y metanólicos de *Lentinus lepideus* sobre los niveles plasmáticos de colesterol. Los datos representan el promedio \pm DE, expresados en %, n=10. *p< 0.05

3.6.2 Evaluación del efecto hipocolesterolemiante de los extractos acuosos y metanólicos de *Calvatia cyathiformis*

Al comparar los niveles de colesterol de los grupos tratados con los extractos acuosos y metanólicos de *Calvatia cyathiformis* con los del grupo control, se observó que ninguno de los extractos produjo una disminución de los niveles de colesterol figura 16.

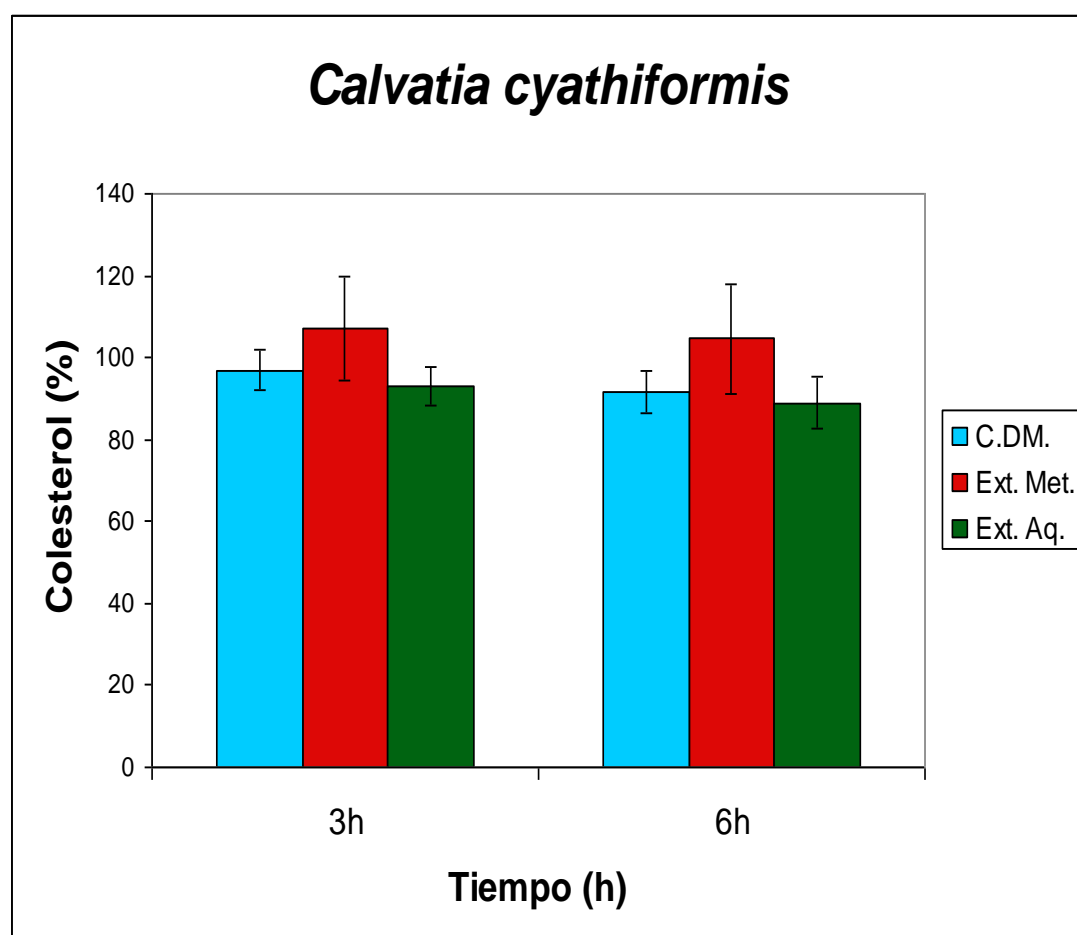


Figura 16. Efecto de los extractos acuosos y metanólicos de *Calvatia cyathiformis* sobre los niveles plasmáticos de colesterol. Los datos representan el promedio \pm DE, expresados en %, n=10. . *p< 0.05

3.6.3 Evaluación del efecto hipocolesterolemiante de los extractos acuosos y metanólicos de *Ganoderma applanatum*

Al comparar los niveles de colesterol de los grupos tratados con los extractos acuosos y metanólicos de *Ganoderma applanatum* con los del grupo control, se observó que ninguno de los extractos produjo una disminución de los niveles de colesterol figura 17.

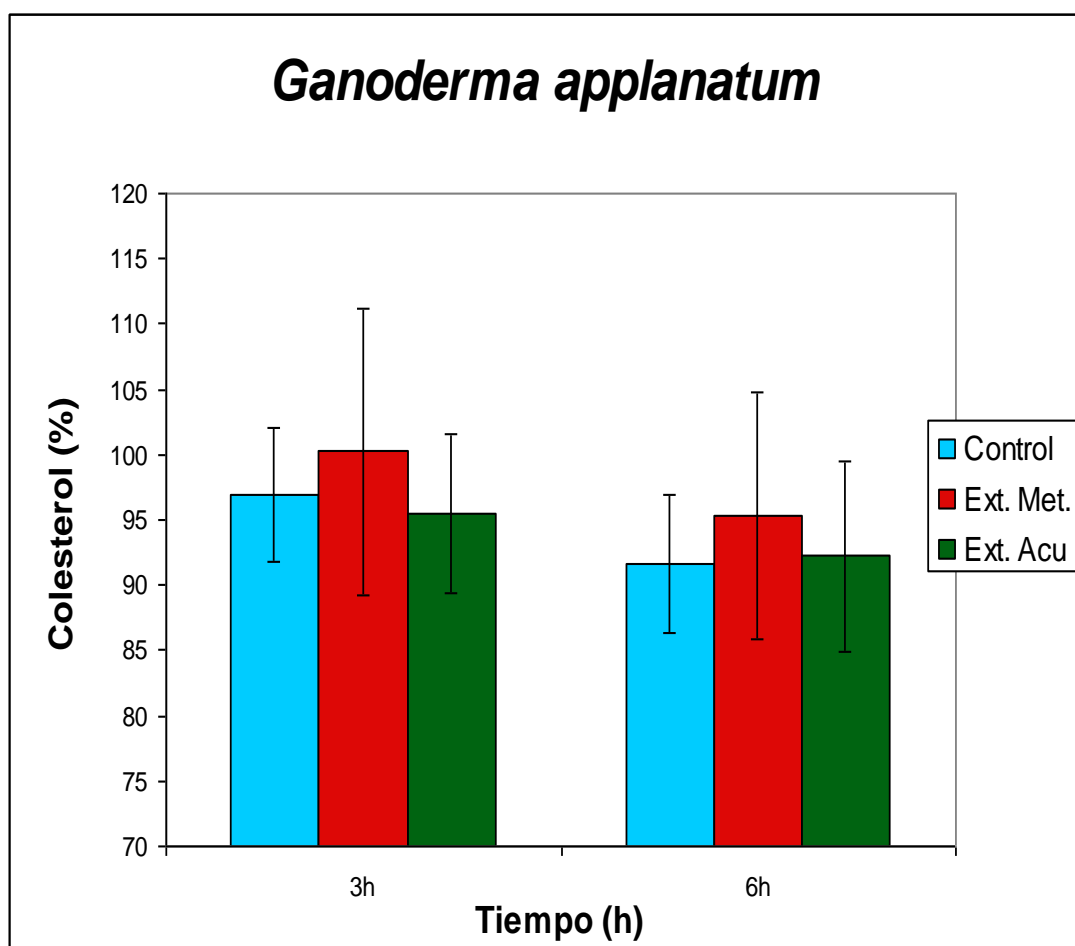


Figura 17. Efecto de los extractos acuosos y metanólicos de *Ganoderma applanatum* sobre los niveles plasmáticos de colesterol. Los datos representan el promedio \pm DE, expresados en %, n=10. . *p< 0.05

3.7 Fraccionamiento inicial biodirigido de *Lentinus lepideus*

Se fraccionó *Lentinus lepideus* y se obtuvieron cuatro fracciones las cuales se denominaron fracción FI (Obtenida por precipitación con etanol), FII (obtenida por precipitación con oxalato de amonio), FIII (obtenida por extracción con NaOH) y FIV (Obtenida con extracción con ácido acético). Las cantidades obtenidas a partir de un gramo de biomasa seca y el porcentaje de recuperación de las fracciones FI, FII, FIII y FIV se muestran en la tabla 15.

Fracciones	Cantidad obtenida (mg)	Recuperación (%)
FI	14.5 \pm 0.05	1.45
FII	31.3 \pm 0.08	3.13
FIII	270.0 \pm 8.00	27.0
FIV	64.0 \pm 6.00	64.0

Tabla 15. Cantidad obtenida (mg) y % de recuperación de las fracciones FI, FII, FIII y FIV de *Lentinus lepideus*.

3.8 Evaluación de la actividad hipoglucemiante de las fracciones FI, FII, FIII y FIV obtenidas de *Lentinus lepideus*

Al evaluar el efecto de las fracciones FI, FII, FIII y FIV obtenidas a partir de extractos de *Lentinus lepideus* sobre los niveles plasmáticos de glucosa, se observó, que de las fracciones evaluadas, la fracción FIV

produjo un efecto hipoglucemiante estadísticamente significativo a las 3 horas y las fracciones FII y FIII produjeron una disminución estadísticamente significativa de glucosa a las 3 y 6 horas. La fracción FI no produjo efecto hipoglucemiante, figura 18.

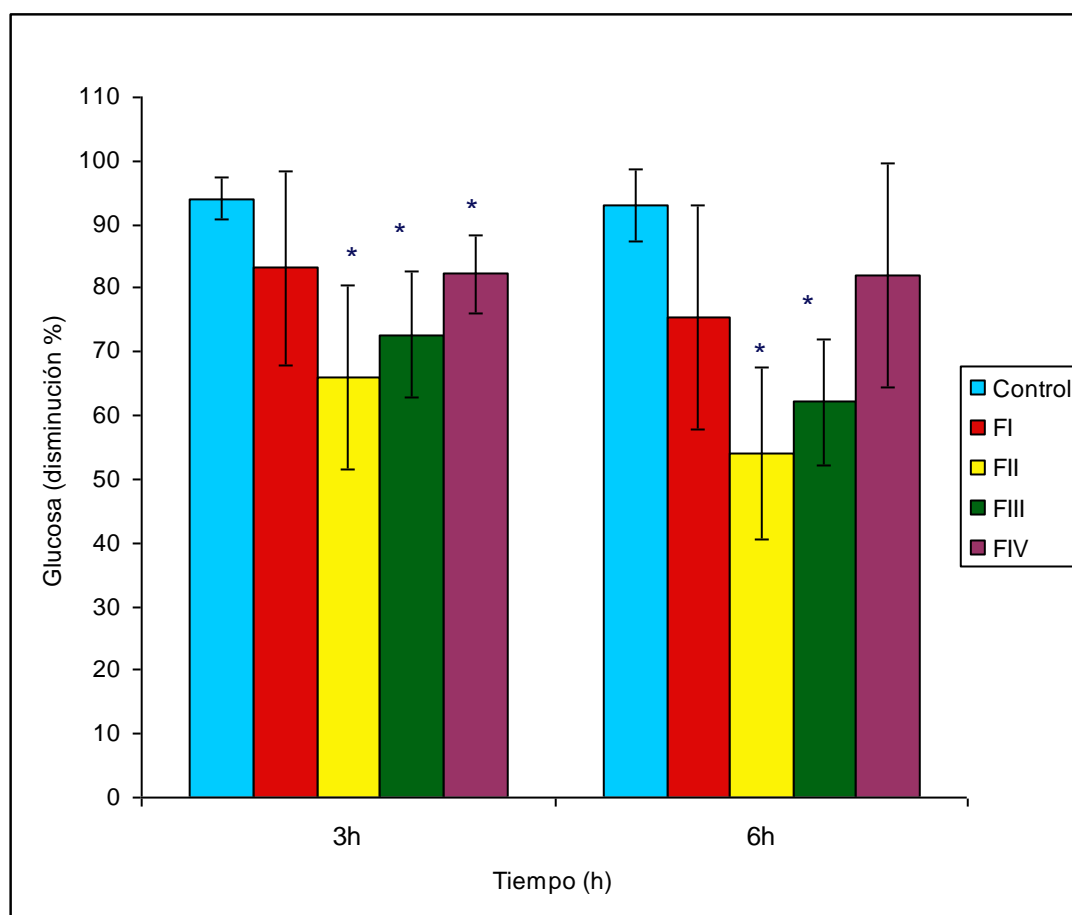


Figura 18. Efecto de las fracciones de *Lentinus lepideus* sobre los niveles plasmáticos de glucosa. Los datos representan el promedio \pm DE, expresados en %, $n=6$. * $p < 0.05$

La tabla 16 muestra los porcentajes de disminución de los niveles de glucosa que produjeron las fracciones FI, FII, FIII y FIV de *Lentinus lepideus*, en las mediciones a las 3 y 6 horas.

TRATAMIENTO	Disminución Glucosa (%) 3 horas	Disminución Glucosa (%) 6 horas
Control	6	7
FI	16	24
FII	34	46
FIII	27	38
FIV	18	18

Tabla 16. Efecto de las fracciones FI, FII, FIII y FIV de *Lentinus lepideus* sobre los niveles plasmáticos de glucosa. Los datos representan el promedio \pm DE expresado en %, n=6. *p< 0.05

Las fracciones FII y FIII fueron las que produjeron el mayor efecto hipoglucemiante. La fracción FII produjo una disminución estadísticamente significativa de los niveles de glucosa de 34% y 46% a las 3 y 6 horas respectivamente y la fracción FIII disminuyó los niveles de glucosa en un 27% y 38% a las 3 y 6 horas respectivamente. Al comparar los niveles de disminución de glucosa de los grupos tratados con las fracciones FI y FII se observó que no hubo diferencia significativa entre ambos grupos, mostrando ambas fracciones tener la misma potencia hipoglucemiante.

Con los resultados obtenidos en cuanto al efecto hipoglucemiante de las fracciones, se procedió a hacer una comparación del efecto hipoglucemiante de las fracciones contra el efecto de la glibenclamida que es un medicamento hipoglucemiante usado como estándar en el tratamiento

de la diabetes. Al respecto no se observó diferencia significativa entre el efecto hipoglucemiante producido por las fracciones FII y FIII a las 3 y 6 horas y el producido por la glibenclamida en los mismos tiempos figura 19.

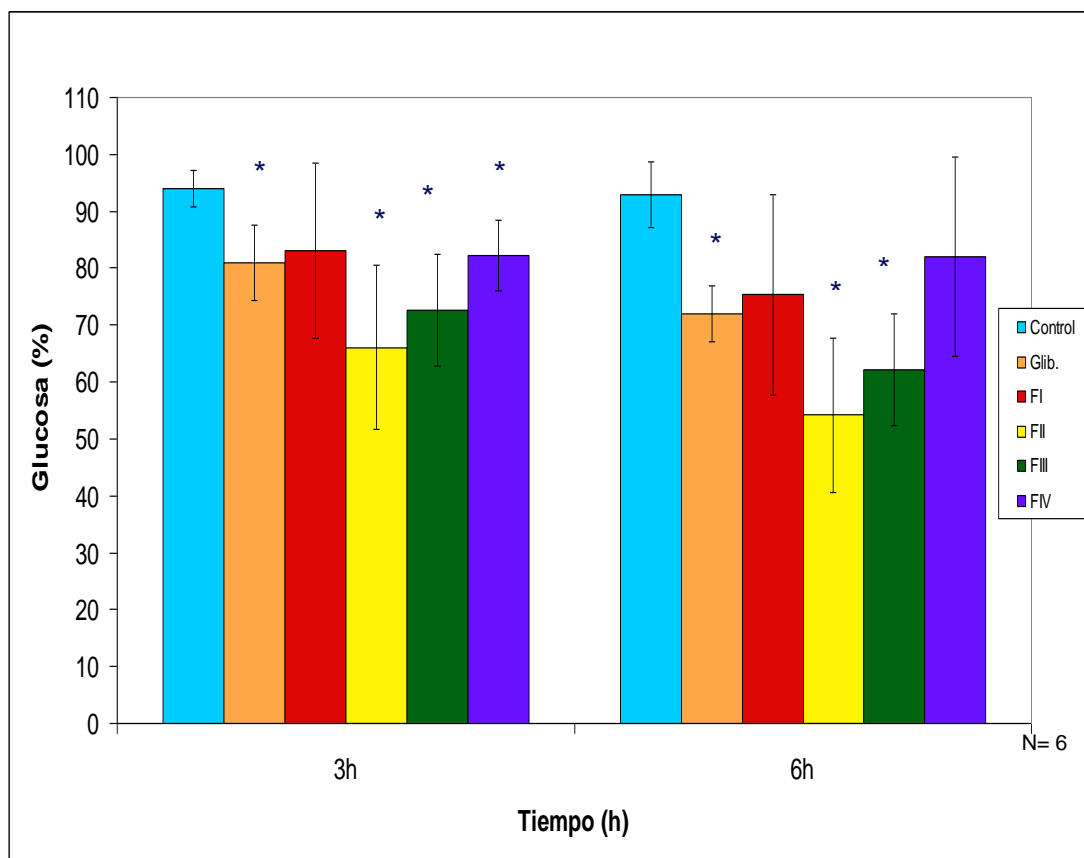


Figura 19. Efecto de las fracciones de *Lentinus lepideus* sobre los niveles plasmáticos de glucosa y su comparación con glibenclamida. Los datos representan el promedio \pm DE, expresados en %, n=6. . *p< 0.05

La tabla 17 muestra los porcentajes de disminución de glucosa plasmática que produjeron las fracciones FI, FII, FIII y FIV de los extractos de *Lentinus lepideus* y su comparación con glibenclamida, en las mediciones a las 3 y 6 horas.

TRATAMIENTO	Disminución Glucosa % 3 horas	Disminución Glucosa % 6 horas
Control	6	7
FI	16	24
FII	34 *	46 *
FIII	27 *	38 *
FIV	18 *	18
Glibenclamida	20 *	28 *

Tabla 17. Efecto de las fracciones FI, FII, FIII y FIV de *Lentinus lepideus* sobre los niveles plasmáticos de glucosa y su comparación con glibenclamida. Los datos representan el promedio \pm DE expresado en %, n=6. *p< 0.05

Se encontró que las fracciones FII y FIII de *Lentinus lepideus* produjeron una disminución de glucosa de potencia semejante a la observada para la glibenclamida.

3.9 Análisis fitoquímico biodirigido de las fracciones más activas de *Lentinus lepideus*

En la evaluación del contenido de proteínas y de carbohidratos de las fracciones FII y FIII se observó que están constituidas por carbohidratos y proteínas, siendo mayor la proporción de carbohidratos (tabla 18).

FRACCIÓN	PROTEÍNAS	CARBOHIDRATOS
FII	23.2%	30.8%
FIII	5%	37.3%

Tabla 18. Contenido en % de proteínas y carbohidratos de las fracciones FII y FIII de *Lentinus lepidus*.

CAPITULO 4

DISCUSIÓN

La diabetes mellitus es una enfermedad sistémica de alta prevalencia en México en donde actualmente constituye una de las principales causas de mortalidad. El alto costo de la terapia farmacológica de la diabetes aunado a que el tratamiento debe continuarse durante toda la vida, ha hecho que la búsqueda de alternativas terapéuticas para esta enfermedad, que pudieran resultar menos costosas, sea un campo de interés creciente.

Recientemente se han aislado compuestos con actividad hipoglucemiante e hipocolesterolemiante de diversas especies de macromicetos que crecen en oriente.

Nuestro país se caracteriza por tener una amplia diversidad de macromicetos sin embargo, el estudio de la actividad biológica de los mismos es un campo inexplorado.

En este contexto el presente estudio constituye el primer reporte de actividad hipoglucemiante e hipocolesterolemia de tres especies de macromicetos que crecen en nuestro país: *Lentinus lepideus*, *Ganoderma applanatum* y *Calvatia Cyathiformis*.

Las especies evaluadas fueron seleccionadas en base a criterios quimiotaxonómicos y etnofarmacológicos, es decir, en base al uso medicinal de estas especies en la medicina tradicional oriental, así como en base al antecedente de la actividad hipoglucemiante e hipocolesterolemia reportada para especies del mismo género que crecen en oriente, como *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum* y *Calvatia gigantea* ^{13-16,26,27,34,35}.

En este estudio el aislamiento de cultivos puros a partir de carpóforos de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* permitió eliminar los contaminantes de los carpóforos y así tener certeza que la actividad hipoglucemiante encontrada corresponde a compuestos bioactivos presentes en los macromicetos y no a hongos o bacterias que pudieran estar presentes en los carpóforos. Con el medio de Melin Norkrans utilizado para el crecimiento y reproducción *in vitro*, de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*, se obtuvo un buen crecimiento para las tres especies.

Para el establecimiento de la diabetes experimental en ratas se utilizó el modelo de aloxana el cual ha sido ampliamente utilizado con este fin. Al respecto con la dosis de 150 mg/Kg sólo el 20% de los animales

desarrollaron diabetes (niveles plasmáticos de glucosa superiores a 200 mg/dL) por lo que fue necesario utilizar una dosis de 300 mg/kg con la cual del 40 al 50% de los animales desarrollaron diabetes ⁵¹.

En relación a la actividad biológica de las especies evaluadas *Lentinus lepideus* y *Calvatia cyathiformis* fueron las especies que produjeron mayor efecto hipoglucemiante. En el caso de *Lentinus lepideus* tanto las fracciones acuosas como las metanólicas produjeron efecto hipoglucemiante, por esta razón y debido a que el género *Lentinus* es uno de los más estudiados en cuanto a su potencial terapéutico, como es el caso del *Lentinus edodes* se decidió seleccionar a *Lentinus lepideus* para su fraccionamiento^{14,16,19-21,27-30}.

En relación al tipo de compuestos contenidos en cada una de las cuatro fracciones obtenidas de *Lentinus lepideus*, la fracción F1, obtenida después de la extracción acuosa y precipitación con etanol corresponde a proteoglicanos solubles en agua. La fracción FII, obtenida con las extracciones con oxalato de amonio al 1% y precipitación con etanol, corresponde a proteoglicanos neutros, la fracción FIII obtenida por precipitación con hidróxido de sodio al 5%, corresponde a proteoglicanos ácidos y la fracción FIV, obtenida con ácido acético, corresponde a proteoglicanos alcalinos.

En la evaluación de la actividad hipoglucemiante de las fracciones obtenidas (FI, FII, FIII y FIV) se encontró que las fracciones FII

(proteoglicanos neutros) y FIII (proteoglicanos ácidos) produjeron el mayor efecto hipoglucemiante. Es importante señalar que al comparar el efecto hipoglucemiante producido por estas fracciones con el efecto producido por la Glibenclamida la acción hipoglucemiante de las fracciones fue igual a la de este medicamento utilizado en la terapia farmacológica convencional de la diabetes. Por lo anterior se sugiere que los compuestos presentes en estas fracciones son muy potentes ya que aún sin haber sido aislados como compuestos puros tuvieron el mismo efecto que el de un fármaco puro.

El análisis fitoquímico de las fracciones FII y FIII de *Lentinus lepideus*, que fueron las más activas, se enfocó a la determinación del contenido de carbohidratos y proteínas, lo anterior debido a que los reportes de los compuestos aislados con actividad hipoglucemiante de especies que crecen en oriente son predominantemente glicoproteínas.

Al respecto se encontró que las fracciones FII y FIII de *Lentinus lepideus* están constituidas por carbohidratos en mayor proporción que proteínas.

Lo anterior concuerda con lo reportado por Byung-Keun Yang y cols en relación a un exopolímero con acción hipoglucemiante, obtenido de *Lentinus edodes* el cual fue descrito como una glicoproteína compuesta por carbohidratos en mayor proporción que proteínas¹⁴.

En este mismo sentido Hui-na Zhang y cols, reportaron que el efecto hipoglucemiante de extractos de *Ganoderma lucidum* se debía a proteoglucanos constituidos por carbohidratos y proteínas, siendo mayor la proporción de los carbohidratos lo cual también es coincidente con los resultados obtenidos para las fracciones FII y FIII de *Lentinus lepideus*¹³.

Los resultados de mayor actividad hipoglucemiante obtenida para las fracciones FII y FIII, que corresponden a polisacáridos neutros y ácidos, respectivamente, concuerdan con los reportes de Kiho y cols quienes encontraron que un compuesto con actividad hipoglucemiante obtenido de *Tremella aurantia* correspondió a un polisacárido ácido. En este mismo sentido Zuamin Yuan y cols reportaron que el efecto hipoglucémico de polisacáridos obtenidos a partir de *Auricularia auricula-judae*, era producido por carbohidratos neutros (β -D glucanos) y carbohidratos ácidos^{50, 56}.

Por otro lado en este estudio ninguna de las especies de macromicetos evaluadas (*Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*) tuvieron efecto hipocolesterolemia.

Estos resultados difieren de los resultados obtenidos por otros investigadores en relación al efecto de disminución de colesterol y triglicéridos encontrado para especies semejantes que crecen en oriente. Cabe señalar que en estos estudios el tiempo de tratamiento fue mayor (semanas o meses)^{35, 57, 58}.

Al respecto es conocido que el tiempo requerido para observar una respuesta de disminución de colesterol con los tratamientos farmacológicos usados para la hipercolesterolemia puede ser de meses. En este estudio la falta de respuesta en disminución de los niveles de colesterol quizá pueda deberse a que el tiempo de tratamiento fue de sólo una semana y cabe la posibilidad de la administración de los tratamientos durante un período mayor pudiera producir un efecto hipocolesterolemizante lo cual será motivo de otro estudio.

El presente constituye el primer reporte de actividad hipoglucemiante de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*, del Noreste de México. Se propone que las especies de macromicetos evaluadas en este estudio son fuentes de sustancias con potencial farmacológico para el tratamiento de la diabetes mellitus.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

1. Los extractos acuosos de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum* tuvieron efecto hipoglucemiante.
2. El extracto metanólico de *Lentinus lepideus* tuvo efecto hipoglucemiante.
3. De las 4 fracciones de *Lentinus lepideus*, las fracciones FII y FIII mostraron efecto hipoglucemiante.
4. El efecto hipoglucemiante de las fracciones FII y FIII de *Lentinus lepideus* fue igual al producido por la glibenclamida.
5. Ninguna de las especies evaluadas, *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*, tuvo efecto hipocolesterolemia.
6. Las especies de macromicetos estudiados, poseen compuestos con potencial farmacológico para el tratamiento de la diabetes mellitus.

PERSPECTIVAS

1. Identificar y aislar él o los compuestos activos.
2. Elucidar el mecanismo de acción hipoglucemiante.
3. Evaluar el potencial de estos compuestos para los efectos farmacológicos descritos.
4. Fraccionar y evaluar el efecto hipoglucemiante de los extractos metanólicos de *Lentinus lepideus*.
5. Evaluar el efecto hipocolesterolemiante de *Lentinus lepideus*, *Calvatia cyathiformis* y *Ganoderma applanatum*, usando un esquema con mayor tiempo de tratamiento
6. Continuar con la evaluación de efecto hipoglucemiante e hipocolesterolemiante de otras especies de macromicetos de México.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Cuenca-Estrella, Manuel y Barba, Raquel. La Medicina en el Antiguo Egipto. Aldebaran Ediciones, Madrid, España. 135-136., 2004.
- 2.- Turnes, Antonio. Introducción a la Historia de la Diabetes Mellitus, Desde la Antigüedad Hasta la era Preinsulínica. 1-25., 2007.
- 3.- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. INEGI. 1° Octubre 2004., 1-12., 2004.
- 4.- Ibarra, Emma y Cantú, Pedro. Años de Vida Productiva Perdidos por Complicaciones Crónicas de Diabetes Mellitus en Población Económicamente Activa. Revista Salud Pública y Nutrición. Vol.4 No.2, Abril-Junio 2003
- 5.- Lozano,R., Torres, L., Lara, J., Santillán, A., Solíz, P., Efectos de la CIE-10 en las Estadísticas de Diabetes Mellitus en México. Sistema Nacional de Información en Salud., 2003.
- 6.- Salud Pública de México. Estadísticas de Mortalidad en México: Muertes Registradas en el año 2003. Vol. 47, No.2, pp 171-173., 2005.
- 7.- Villarreal-Ríos, E., Salinas-Martínez, A., Medina-Jáuregui, A., Garza-Elizondo, M., Nuñez-Rocha, G., and Chuy-Díaz, E. The Cost of Diabetes Mellitus and Its Impact on Health Spending in México. Archives of Medical Research. 31, 511-514., 2000.
- 8.- West, S., Klein, R., Rodríguez, J., Muñoz, B., Broman, A., Sánchez, R., and Snyder, R., Diabetes and Diabetic Retinopathy in a Mexican-American Population. Epidemiology Healt Services Psychosocial Research. Diabetes Care, 24:1204-1209., 2001.
- 9.- Rivera, J., Barquera, S., Campirano, F., Campos, I., Safdie, M., and Tovar, V., Epidemiological and Nutricional Transition in México: Rapid Increase of Non-Communicable Chronic Diseases and Obesity. Public Health Nutrition: 5 (1A), 113-122., 2002.
- 10.- Goodman, A. y cols. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Novena edición. Vol. II., 1603-1607., 1996.
- 11.- Díaz, José Luis y cols., Uso de Plantas Medicinales de México. Instituto Mexicano Para el Estudio de Plantas Medicinales A.C., Monografías Científicas II.,145-146., 1976.

- 12.- Somani, Rahul. Kasture, Sanjay y Kumar, Abhay. Antidiabetic Potencial of *Butea monosperma* in rats. *Fitoterapia* 77: 86-90., 2006.
- 13.- Zhang, HN., Lin, Z., Hypoglycemic effect of *Ganoderma lucidum* Polysaccharides. *Acta Pharmacol Sin.* Feb. 25(2): 191-195., 2004.
- 14.- Yang, B., Kim, D., Jeong, S., Das, S., Choi, Y., Shin, J., Lee, S., and Song, C. Hypoglycemic Effect of a *Lentinus edodes* Exo-polymer Produced from a Submerged Mycelial Culture. *Biosci.Biotech.Biochem.*, 66 (5), 937-942., 2002.
- 15.- Wasser, S.P., and Weis, A.L., Therapeutic Effects of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: A Modern Perspective. *Critical Reviews in Immunology*, 19; 65-69., 1999.
- 16.- Hobbs, C. Medicinal Mushrooms: An Exploration of Tradition, Healing and Culture. Botanic Press, Santa Cruz., 2004.
- 17.- Dickinson, C. et al., The Encyclopedia of the Mushrooms. Crescent Books, New York., 1982.
- 18.- Yang, Q., and Jong, S., Medicinal Mushrooms in China. *Mushrooms Science XII (Part.I)*: 631-643., 1989.
- 19.- Ikekawa, T et al. Antitumor Activity of Aqueous Extract of Edible Mushrooms. *Cancer Res.* 29:734-735., 1969.
- 20.- Chihara, G; Maeda,Y; Hamuro, J; Sasaki, T. and Fukuoka, F. Inhibition of Mouse Sarcoma 180 by Polysaccharides From *Lentinus edodes*. *Nature.* 222: 687-688., 1969.
- 21.- Chihara, G et al. Antitumor and Metastasis-inhibitory Activities of *Lentinan* as an Immunomodulator: An Overview. *Cancer Detect Prev.* 1: 423-443., 1987.
- 22.- Hirasawa, M et al. Three Kinds of Antibacterial Substances From *Lentinus edodes* (Berk) Sing (Shiitake, an edible mushroom). *Int. Journal of Antimicrobial Agents.* 11: 151-157., 1999.
- 23.- Hatvani, N . Antibacterial Effect of the Culture Fluid of *Lentinus edodes* Mycelium Grown in Submerged Liquid Culture. *Int. Journal of Antimicrobial Agents.* 17: 71-74., 2001.
- 24.- Hideyuki, Matsuura; Asakawa, Chikako; Kurimoto, Masanori. α -Glucosidase Inhibitor from the Seeds of Balsam Pear (*Momordica charantia*) and the Fruit Bodies of *Grifola Frondosa*. *Biosci. Biotechnol.Biochem.*, 66(7), 1576-1578., 2002.

- 25.- Hiroko, R et al. Growth and Antibacterial Activity of *Lentinus edodes* in Liquid Media Supplemented With Agricultural Wastes. Electronic Journal Biotechnol. 8(2): 94-99., 2005.
- 26.- Wasser, S., and Weis, A., Therapeutic Effects of Substances Occurring in Higher Basidiomycetes Mushrooms: A Modern Perspective. Crit Rev in Immunol. 1999b. 19: 65-96., 1999.
- 27.- Chang, R. Functional Properties of Edibles Mushroom. Nutr Rev. 54(11): 91-93., 1996.
- 28.- Hokama, Y., and Hokama, J., In Vitro Inhibition of Platelet Aggregation Whit Low Dalton Compounds From Aqueous Dialysates of Edible Fungi. Research Communications in Chemistry, Patology and Pharmacology 31, 17-180., 1981.
- 29.- Kabir, Y. and Kimura, S., Dietary Mushrooms Reduce Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats. Journal of Nutritional Science and Vitaminology. 35, 91-94., 1989.
- 30.- Sugiyama, K., and Yamakawa, A., Dietary Eritadenina-induced Alteration of Molecular Species Composition of Phospholipids in Rats. Lipids 31, 399-404., 1996.
- 31.- Stapleton, D., Mitchelhill, K., Gao, G., Widmer, J., Mitchel, B., The, T., House, C., Thornton, C., Snowden, M., Carling, D., J. Biol Chem 273: 12443-12450., 1998.
- 32.- Vavvas, D., Apazidis, A., Saha, A., Gamble, J., Patel, A., Kemp, B., Witters, L., Ruderman, N., J Biol Chem 272:13255-13261., 1997.
- 33.- Cavazzoni, V., and Adami, A., Exopolysaccharides Produced by Mycelial Edible Mushrooms. Ital. J. Food Sci., 1, 9-15., 1992.
- 34.- Kabir, Y., Kimura S., and Tamura, T. Dietary Effect of *Ganoderma lucidum* Mushroom on Blood Pressure and Lipid Levels in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR). J. Nut. Sci Vitaminol. 34: 433-438., 1988.
- 35.- Berger, A., Rein, D., Kratky, E., Monnard, I., Meirim, I., Piguët-Welsch, C., Hauser, J., Mace, K., and Niederberger, P., Cholesterol-lowering properties of *Ganoderma lucidum* *in Vitro*, *ex Vivo*, and in Hamsters and Minipigs. Lipids in Health and Disease, 3:2., 2004.
- 36.- Jong, S., and Donovan, R., Medicinal Benefits of the Mushroom *Ganoderma*., Adv. Appl. Microbiol., 37, 101-134., 1992.
- 37.- Hikino, H., Ishiyama, M., Suzuki, Y., and Cono, C., Mechanisms of Hypoglycemic Activity of Ganoderan B: a Glycan of *Ganoderma lucidum* Fruit Bodies. Planta Med., 55: 423-428., 1989.

- 38.- Sripuan, Thida; Auki, Kazuhiro; Yamamoto, Kenji; Tangkao, Dara and Kumagai, Hidehiko. Purification and Characterization of Thermostable α -Galactosidase from *Ganoderma lucidum*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 67 (7), 1485-1491., 2003.
- 39.- Kim, B et al. Studies on Constituents of Higher Fungi of Korea (LXVIII) Antitumor Components of the Cultured Mycelia of *Ganoderma lucidum*. Korean J Pharmacol., 24:203-212. 1993.
- 40.- Hikino, H; Konno, C; Mirin, Y, and Hayashi, T. Isolation and Hypoglycemic Activity of Ganoderans A and B, Glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. Planta Med., 4: 339-340. 1985.
- 41.- Kato, K. et al., Chemical Features of Water-Soluble Polysaccharides in the Fruit Body of *Grifola frondosa*. Gifu Daigaku Nogakubu Kenkyuu Hokoku: 199-203. From CA 113:37718t. 1989.
- 42.- Sekizawa, N. et al., Edible Mushrooms .I. Analytical Method for 5'-nucleotides and their Contents in Mushrooms. Iwate-ken Jozo Shokuhin Sheikenjo Hokoku 130-134. From CA 110:6467a. 1988.
- 43.- Sekizawa, N. et al., Processing of Edible Mushrooms. II. Differences in 5'-Mononucleotide Content Depending on Kinds of Mushroom and Drying Methods. Iwate-ken Jozo Shokuhin Sheikenjo Hokoku: 85-89. From CA 112:20159t. 1989.
- 44.- Chang, H. et al., Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica. Vol.1. Singapore: World Scientific. 1986.
- 45.- Chang, H. et al., Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica. Vol.2. Singapore: World Scientific. 1987.
- 46.- Yokoyama, A. et al., Distribution of Tetracyclin Triterpenoides of Lanostane Group and Sterols in the Higher Fungi Especially of the *Polyporaceae* and Related Families. Phytochemistry, 14:487-497. 1975.
- 47.- Ying, J. et al., Icones of Medicinal Fungi From China. Traslated by X. Yuehan. Beijing: Science Press. 1987.
- 48.- Kim, C. et al., Studies on Constituents of Higher Fungi of Korea (LXIV). Constituents of Cultured and Fused Mycelia of *Ganoderma lucidum*. Soul Taehakkyo Yakhak Nonmunjip. 15:38-71. From CA. 1990.
- 49.- Chalenger, A. Utilización y Conservación de los Ecosistemas Terrestres de México. Pasado, Presente y Futuro. CONABIO, Instituto de Biología, UNAM., Agrupación Sierra Madre, S.C. 1998.
- 50.- Guzmán, G. Inventorying The Fungi of México. Biod. And Conser. 1998a. 7:369-384. 1998.

- 51.- Ramos, Héctor y Méndez José. Diabetes Mellitus Experimental. Ciencia Veterinaria., 6: 347-377. 1994.
- 52.- Stamets, P et al. The Mushroom Cultivador. A Practical Guide to Growing Mushrooms at Home., 15-37. 1983.
- 53.- Mizuno T. Fractionation and Characterization of Antitumor Polisaccharides from *Maitake*, *Grifola frondosa*, Agric.Biol.Chem., 50 (7): 1679-1688. 1986.
- 54.- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, L., and Randall, R., Protein Measurement With the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275. 1951.
- 55.- Nelson, D. et al. Lehninger, Principles of Biochemistry. Worth Publishers. E.U.A. 2000.
- 56.- Kiho, T; Marimoto, H; Sakushima, M; Usui, S. and Ukai, S., Polysaccharides in fungi.XXXV. Antidiabetic activity of an acidic polysaccharide from the fruiting bodies of *Tremella aurantia*.,Gifu Pharmaceutical University, Japan., Biol Pharm Bull. 1995 Dec., 18 (12): 1627-1629. 1995.
- 57.- Shimada, Y., Yamakawa, A., Morita, T., and Sugiyama, K., Effects of Dietary Eritadenine on the Liver Microsomal delta6-Desaturase Activity and Its mRNA in Rats. Biosci. Biotechnol. Biochem., 67 (6), 1258-1266, 2003.
- 58.- Fukushima, M., Ohashi, T., Fujiwara, Y., Sonoyama, K., and Nakano, M., Cholesterol-Lowering Effects of *Maitake* (*Grifola frondosa*) Fiber, *Shiitake* (*Lentinus edodes*) fiber, and *Enokitake* (*Flammulina velutipes*) Fiber in Rats. Society for Experimental Biology and Medicine, Marc 14, 2001. pp 758-765. 2001.
- 59.- Ying, J. et al. Icons of Medicinal Fungi From China. Translated by X. Yuehan. Beijing: Science Press. Beijing, 575. 1987.
- 60.- Kim, C. et al. Studies on Constituents of Higher Fungi of Korea (LXIV). Constituents of Cultured and Fused Mycelia of *Ganoderma lucidum*. Soul Taehakkyo Yakhak Nonmunjip. 15:38-71. From CA 115:251763p., 1990.
- 61.- Garza-Ocañas, L., y cols. Evaluación de la Actividad Biológica de Extractos Acuosa de Macromicetos del Noreste de México. Ciencia, UANL., 9 (2): 164-170., 2006.
- 62.- Shie, Y et-al. Evaluación of the Hepatic and Renal-protective Effects of *Ganoderma lucidum* in Mice. Am. J. Chin Med. 29: 501-507., 2001.

- 63.- Olaiz-Fernández, G., y cols. Diabetes Mellitus en Adultos Mexicanos. Resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2000. Salud Pública México., Volúmen 49, suplemento 3., 2007.
- 64.- Hikino, H., Ishiyama, M., Suzuki, Y., Cono, C., Mechanisms of Hypoglycemic Activity of Ganoderan B: a Glycan of *Ganoderma lucidum* Fruit Bodies. Planta Med., 55: 423-428., 1989.
- 65.- Wang, G., et al. Antitumor Active Polysaccharides From the Chinese Mushrooms Songshan Lingzhi, the Fruting Body of *Ganoderma tsuagae*., Biosci. Biotechnol., Biochem., 57, 894-900., 1993.
- 66.- Furusawa E; Chou, S.C; Furusawa, S; Hirazumi, A; and Dong, Y., Anti-tumor Activity of *Ganoderma lucidum*, an Edible Mushroom, on Intraperitoneally Implanted Lewis Lung Carcinoma in Synergic Mice. Phytother .Res., 6, 300-304., 1992.
- 67.- Mizuno, M. et al. Anti-tumor Polysaccharides from Mushroom During Storages. Biofactors., 12 (1-4): 257-281., 2000.
- 68.- Yuan, Zuomin., Puming, He., Jianhui, Cui and Takeuchi, Hisanao. Hipoglycemic Effect of Water –soluble Polysaccharide from *Auricularia auricula-judae* Quel. On Genetically Diabetic KK-A Mice, Biosci.Biotechnol. Biochem., 1898-1903., 1998.
- 69.- Alarcon-Aguilara, FJ., Roman-Ramos, R., Pérez-Gutierrez, S., Study of the Anti-hyperglycemic effect of Plants Used as Antidiabetics. J. Ethnopharmacol., 61 (Pt2): 101-110., 1998;
- 70.- Lin ZB, editor. Modern Research of *Ganoderma* 2nd ed. Beijing: Beijing Medical University Press, 2001.
- 71.- Grover, JK., Yadav, S., Vats, V., Medicinal Plants of India With Anti-diabetic Potential. J. Ethnopharmacol ., 81: 81-100., 2002.
- 72.- Miyazaki, T, and Nishijima, M. et al. Studies on Fungal Polysaccharides. XXVII. Structural Examination of Water-soluble, Antitumor Polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. Chem Pharm Bull., 29: 3611-3616., 1981.
- 73.- Lang, J., Molecular Mechanism and Regulation of Insulin Exocytosis as a Paradigm of Endocrine Secretion. Eur. J. Biochem., 259: 3-17., 1999.
- 74.- Kabir, Y; Yamaguchi, M. and Kimura, S. Effects of *Shiitake* (*Lentinus edodes*) and *Maitake* (*Grifola frondosa*) Mushrooms on Blood Pressure and Plasma Lipids of Spontaneously Hypertensive Rats. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 33, 341-346., 1987.
- 75.- Kaneda, T. and Tokuda, S. Effect of Various Mushroom Preparation on Cholesterol Levels in Rats. J. Nutr. Rep. Int., 26, 167-173., 1966.

- 76.- Kim, M., Park, M., and Kim, G., Effects of Mushroom Protein-bound Polysaccharides on the Blood Glucose Levels and Energy Metabolism in Streptozotocin-induced Diabetic Rats. *J. Kor. Nutr.*, 30, 743-750., 1997;
- 77.- Vázquez-Martínez, J.; Gómez-Dantés, H.; Fernández-Cantón, S. Diabetes Mellitus en Población Adulta del IMSS. Resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2000., *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.*, 44 (1): 13-26., 2006.
- 78.- Kiho, T. Itahashi, S; Sakushima, M; Matsunaga, T; Usui, S; Ukai, S; Mori, H; Sakamoto, H. and Ishiguro, Y., Polysaccharide in Fungi. XXXVIII. Anti-diabetic Activity and Structural Features of Galactomannan Elaborated by *Pestalotiopsis species.*, *Bio. Pharm. Bull.*, 20, 118-121., 1997.
- 79.- Bar-on, H., and Roheim, P., Hyperlipidemia in Streptozotocin-treated rats. *Diabetes.*, 25: 509-515., 1976.,
- 80.- Chihara, G., et al. Fractionation and Purification of the Polysaccharides with Marked Antitumor Activity, Especially Lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an Edible Mushroom). *Cancer Research* 30, 2776-2781., November 1970.
- 81.- Creech, H., and Breuninger, E., Polysaccharide-Peptide Complex from *Serratia marscescens* Cells. *Can. J. Biochem.*, 42: 593-603., 1962.
- 82.- Shibata, S., Nishikawa, Y., Mei, C., Fukuoka, F., and Nakanishi, M., Antitumor Studies on Some Extracts of Basidiomycetes. *Gann*, 59: 159-161., 1968.
- 83.- Nishina PM., Freedland RA. Effects of Propionate on Lipid Biosynthesis in Isolated Rat Hepatocytes. *J. Nutr* 120:668-673., 1990
- 84.- Sonoyama, K., Nishikawa, H., Kiriama, S., and Niki, R., Apolipoprotein mRNA in Liver and Intestine of Rats is Affected by Dietary Beet Fiber or Cholestyramine. *J. Nutr.* 125:13-19., 1995.
- 85.- Chen, WJ., and Anderson, J. Propionate may Mediate The Hypocholesterolemic Effects of Certain Soluble Plant Fiber in Cholesterol-Fed Rats. *Proc. Soc. Exp Biol Med* 175:215-218., 1984
- 86.- Bobek, P., Ozdin, L., Kuniak, L., Effect of Oyster Mushrooms (*Pleurotus ostreatus*) and its Ethanolic Extract in Diet on Absorption and Turnover of Cholesterol in Hypercholesterolemic rats. *Nahrung* 40:222-224., 1996.

- 87.- American Institute of Nutrition. Report of the American Institute of Nutrition ad hoc Committee on Standards for Nutritional Studies. J.Nutr. 107:1340-1348., 1977.
- 88.- Fukushima M., Nakano, M., Morii, Y., Ohashi, T., Fujiwara, Y., and Sonoyama, K. Hepatic LDL Receptor mRNA in Rats is Increased by Dietary Mushroom (*Agaricus bisporus*) Fiber an Sugar Beet Fiber. J Nutr 130:2151-2156., 2000.
- 89.- Hannai, H. et al. Long-term Effects of Water-Soluble Corn Bran Hemicellulose on Glucose Tolerance in Obese and no Obese Patients: Improved Insulin Sensitivity and Glucose Metabolism in Obese Subjects. Biosci. Biotech. Biochem., 61, 1358-1361., 1997.
- 90.- Gorray, K., and Fujimoto, W. In Vitro Toxicity of Alloxan for Guinea Pig B Cells: Comparison With Rat B Cells. Society for Experimental Biology and Medicine., Vol173, 606-612., 1983.

APÉNDICE A.

Método de Lowry.

APÉNDICE A.

Método de Lowry.

1. Preparación de la solución C.

1^a. Preparación de la solución A:

Se colocaron 20 g de Na_2CO_3 con 4 g de NaOH y se aforó el matraz a 1L con agua libre de iones.

1b. Preparación de la solución B:

Se preparó una solución de 0.78 g de Cu_2SO_4 en 20 mL de agua libre de iones. Por otro lado, se preparó una solución con 1.34 g de tartrato de sodio y potasio disueltos en 20 mL de agua libre de iones.

La solución B se preparó mediante la mezcla de las soluciones anteriores, una vez mezcladas, se aforó el matraz a 1L con agua libre de iones.

1c. Preparación de la solución C:

Se mezclaron 50 mL de la solución A con 1 mL de la solución B.

II. Preparación del reactivo de Folin-ciocalteau.

Se mezclaron 10 mL del reactivo de Folin con 19 mL de agua libre de iones.

APÉNDICE B

Técnica de la medición de glucosa y colesterol.

APÉNDICE B

Técnica de la medición de glucosa y colesterol.

1. Se utilizó un aparato de medición de glucosa, colesterol y triglicéridos de la marca Accutrend® GCT , fabricado por Roche Diagnostics GMBH D-68298 Mannheim Alemania.
2. Principio de la medición: determinación de la glucosa, colesterol y triglicéridos mediante fotometría de reflexión con sangre capilar fresca.
3. Sistema óptico LED (657 nm).
4. Rango de medición:

Glucemia	20 – 600 mg/dL
	(1.1 – 33.3 mmol/L)
Colesterol	150 – 300 mg/dL
	(3.88 – 6.86 mmol/L)
Triglicéridos	70 – 600 mg/dL
	(0.80 – 6.86 mmol/L)

5. Duración de la medición:	Glucemia	12 segundos
	Colesterol	180 segundos
	Triglicéridos máx.	174 segundos